



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06025295 A**(43) Date of publication of application: **01.02.94**

(51) Int. Cl

**C07K 13/00**  
**C07K 7/06**  
**C07K 7/08**  
**C07K 15/28**  
**C12N 5/26**  
**C12N 15/12**  
**C12P 21/08**  
**G01N 33/53**  
**G01N 33/577**  
**// A61K 37/02**  
**A61K 39/395**  
**C12N 15/08**  
**C12P 21/02**  
**(C12P 21/08 , C12R 1:91 ), (C12P 21/02**  
**, C12R 1:19 )**  
**C07K 99:00**

(21) Application number: **04301582**(22) Date of filing: **15.10.92**

(30) Priority: **16.10.91 JP 03294856**  
**16.10.91 JP 03294857**  
**17.04.92 JP 04122906**  
**30.04.92 JP 04135692**

(71) Applicant: **BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK**

(72) Inventor: **HIRAI YOHEI**  
**TAKASHINA MAKOTO**  
**TAKEBE KYOKO**

**(54) NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE**  
**EPIMORPHINE, GENE CAPABLE OF CODING**  
**THE SAME AND ANTIBODY TO EPIMORPHINE**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a new physiologically active substance, epimorphine, having morphogenetic action on epithelial tissues.

**CONSTITUTION:** The new physiologically active substance, epimorphine, has morphogenetic action on epithelial tissues and can be expressed by a gene hybridizing with a gene probe constructed of a base sequence complementary to the base sequence of ATGCGGGACCGGCTGCCAGACCTGACGGCGTGTAG G prepared by a mesenchyme cell derived from a human or a mouse and the isoform of the epimorphine. The

objective base sequence of a gene capable of coding them and a soluble epimorphine obtained by modifying the polypeptide of the epimorphine. The objective polyclonal antibody and monoclonal antibody against the epimorphine and the objective method for purifying and detecting the epimorphine utilizing the antibody. This new physiologically active substance, epimorphine, is useful for elucidating the mechanism of onset of diseases caused by an abnormality of epithelial form, developing, etc., the diagnostic and therapeutic method for the diseases.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&amp;Japio

(19)日本国特許庁(JP)

## (12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-25295

(43)公開日 平成6年(1994)2月1日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00	Z N A	8619-4H		
7/06	Z	8318-4H		
7/08		7537-4H		
		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数19(全 42 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平4-301582	(71)出願人	591082269 株式会社バイオマテリアル研究所 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地
(22)出願日	平成4年(1992)10月15日	(72)発明者	平井 洋平 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会 社バイオマテリアル研究所内
(31)優先権主張番号	特願平3-294856	(72)発明者	高階 誠 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会 社バイオマテリアル研究所内
(32)優先日	平3(1991)10月16日	(72)発明者	武部 京子 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会 社バイオマテリアル研究所内
(33)優先権主張国	日本(JP)	(74)代理人	弁理士 須藤 政彦
(31)優先権主張番号	特願平3-294857		
(32)優先日	平3(1991)10月16日		
(33)優先権主張国	日本(JP)		
(31)優先権主張番号	特願平4-122906		
(32)優先日	平4(1992)4月17日		
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規生理活性物質エピモルフィン、それをコードする  
モルフィンに対する抗体

遺伝子及びエピ

## (57)【要約】

【目的】 上皮組織の形態形成作用を有する新規生理活性物質エピモルフィンを提供する。

【構成】 上皮組織の形態形成作用を有し、ヒトもしくはマウス由来の間充細胞が作る、ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGGの塩基配列と相補的な塩基配列で構成される遺伝子プローブとハイブリダイズする遺伝子によって発現され得る新規生理活性物質エピモルフィン及び当該エピモルフィンのアイソフォーム、これらをコードする遺伝子の塩基配列、当該エピモルフィンのポリペプチドを改変した可溶性エピモルフィン、当該エピモルフィンに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体、及び当該抗体を利用したエピモルフィンの精製、検出法。

【効果】 上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、当該疾患の診断法、治療法の開発等に有用である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の式(1)の塩基配列と相補的な塩基配列で構成される遺伝子プローブとハイブリダイズする遺伝子によって発現され得る新規生理活性物質エピモルフィン。

式(1)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【請求項2】 ヒト由来の間充細胞が作る、前記請求項1記載の生理活性物質エピモルフィン。

【請求項3】 マウス由来の間充細胞が作る、前記請求項1記載の生理活性物質エピモルフィン。

【請求項4】 アミノ末端のアミノ酸残基の配列が、下 \*

式(3)

Met	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Asn	Asp	Asp			
																5	10	15
Gly	Asp	Thr	Val	Val	Val	Val	Glu	Lys	Asp	His	Phe	Met	Asp	Asp	Phe			
																20	25	30
Phe	His	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln			
																35	40	45
Tyr	Val	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Asn	His	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Ala	Pro			
																50	55	60
Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu			
																65	70	75
Ile	Lys	Lys	Thr	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Ile	Glu			
																85	90	95
Gln	Ser	Phe	Asp	Gln	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Asp	Leu			
																100	105	110
Arg	Ile	Arg	Arg	Thr	Gln	His	Ser	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Phe	Val	Glu			
																115	120	125
Ala	Met	Ala	Glu	Tyr	Asn	Glu	Ala	Gln	Thr	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Ser			
																130	135	140
Lys	Gly	Arg	Ile	Gln	Arg	Gln	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr			
																145	150	155
Asp	Asp	Glu	Leu	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ser	Ile	Phe			
																165	170	175
Thr	Ser	Asp	Ile	Ile	Ser	Asp	Ser	Gln	Ile	Thr	Arg	Gln	Ala	Leu	Asn			
																180	185	190
Glu	Ile	Glu	Ser	Arg	His	Lys	Asp	Ile	Met	Lys	Leu	Glu	Thr	Ser	Ile			
																195	200	205
Arg	Glu	Leu	His	Glu	Met	Phe	Met	Asp	Met	Ala	Met	Phe	Val	Glu	Thr			
																210	215	220
Gln	Gly	Glu	Met	Ile	Asn	Asn	Ile	Glu	Arg	Asn	Val	Met	Asn	Ala	Thr			
																225	230	235
Asp	Tyr	Val	Glu	His	Ala	Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Ala	Ile	Lys	Tyr			
																245	250	255
Gln	Ser	Lys	Ala	Arg	Arg	Lys	Lys	Trp	Ile	Ile	Ile	Ala	Val	Ser	Val			
																260	265	270
Val	Leu	Val	Val	Ile	Ile	Val	Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Ser	Val	Gly	Lys			
																275	280	285

式(4)

50

\* 記の式(2)のとおりである前記請求項1記載の生理活性物質エピモルフィン。

式(2)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【請求項5】 ヒト由来の間充細胞が作る、前記請求項4記載の生理活性物質エピモルフィン。

【請求項6】 マウス由来の間充細胞が作る、前記請求項4記載の生理活性物質エピモルフィン。

【請求項7】 下記の式(3)、(4)、又は(5)のうちのいずれか1種のアミノ酸配列で表される、前記請求項5記載のヒトエピモルフィン。

3

4

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp  
                     5                    10                    15  
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe  
                     20                    25                    30  
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln  
                     35                    40                    45  
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
                     50                    55                    60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
                     65                    70                    75                    80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu  
                     85                    90                    95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu  
                     100                    105                    110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
                     115                    120                    125  
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
                     130                    135                    140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
                     145                    150                    155                    160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
                     165                    170                    175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
                     180                    185                    190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
                     195                    200                    205  
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
                     210                    215                    220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
                     225                    230                    235                    240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
                     245                    250                    255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile  
                     260                    265                    270  
 Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser  
                     275                    280                    285

式(5)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp  
                     5                    10                    15  
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe  
                     20                    25                    30  
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln  
                     35                    40                    45  
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
                     50                    55                    60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
                     65                    70                    75                    80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu  
                     85                    90                    95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu

5 100 105 110 6

Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125

Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140

Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
 145 150 155 160

Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175

Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
 225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro  
 260 265 270

Arg Ala Ile Tyr Pro  
 275

【請求項8】 下記の式(6)、(7)、又は(8)の \* 7記載のヒトエピモルフィンをコードする遺伝子。  
 うちのいずれか1種の塩基配列で表される、前記請求項 \*

式(6)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16  
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32  
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48  
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64  
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80  
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96  
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112  
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128  
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144  
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160  
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176  
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192  
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208  
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224  
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240  
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256  
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGG ATA ATT ATT GCT GTG TCA GTG 272  
 GTT CTG GTT GTC ATA ATC GTT CTA ATT ATT GGC TTG TCA GTT GGC AAA 288  
 TGA 289

式(7)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16  
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32  
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48  
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC GCG ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64

7 8

AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80  
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96  
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112  
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128  
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144  
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160  
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176  
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192  
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208  
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224  
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240  
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256  
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA TTG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA ATT 272  
 GTT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 288

式(8)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16  
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32  
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48  
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64  
 AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80  
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96  
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112  
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128  
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144  
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160  
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176  
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192  
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208  
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224  
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240  
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256  
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG CAA CAA CAT TGT CAT AGC AAC CAT ATC CCA 272  
 AGA GCC ATT TAT CCT TGA 278

【請求項9】 下記の式(9)、(10)、又は(1) \* 前記請求項6記載のマウスエピモルフィン。  
 1) のうちのいずれか1種のアミノ酸配列で表される、 \*

式(9)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110

9

10

Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala  
 260 265 270  
 Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu ser Val Gly  
 275 280 285

Lys

式(10)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met50 Asp Met Ala Met Phe Val Glu

11		12
210	215	220
Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser		
225	230	235
Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys		240
	245	250
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val		255
	260	265
Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser		270
275	280	285
式 (11)		
Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp		
1	5	10
Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly		15
	20	25
Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala		30
	35	40
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala		45
50	55	60
Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys		
65	70	75
Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile		80
	85	90
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp		95
100	105	110
Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val		
115	120	125
Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg		
130	135	140
Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr		
145	150	155
Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile		160
	165	170
Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu		175
180	185	190
Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser		
195	200	205
Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu		
210	215	220
Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser		
225	230	235
Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys		240
	245	250
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn Arg Thr		255
	260	265
Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg		270
275		

【請求項10】 下記の式(12)、(13)、又は \* 前記請求項9記載のマウスエピモルフィンをコードする  
(14)のうちのいずれか1種の塩基配列で表される、\* 遺伝子。

式(12)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG5CCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16



13

14

GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 272  
 GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 288  
 AAA TGA 290

式(13)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAG GTG ATG TTC GTC CTC ATT TGT GTA 272  
 GTC ACT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATT CTC GCA ACA GCA TTG TCA 288  
 TAG 289

式(14)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176

15

TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG CAA CAG CAT TGT CAT AGC AAC CGT ACC 272  
 CCA AGA GCT CTT TGT CCT CGG TGA 280

16

【請求項11】 前記請求項1記載のエピモルフィンのポリペプチドのカルボキシ末端疎水性部分を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、改変エピモルフィン。

【請求項12】 前記請求項7記載のヒトエピモルフィンのポリペプチドのN末端より230番目ないし263番目以降のC末端アミノ酸残基を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、前記請求項11記載のヒト改変エピモルフィン。

【請求項13】 前記請求項9記載のマウスエピモルフィンのポリペプチドのN末端より231番目ないし264番目以降のC末端アミノ酸残基を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、前記請求項11記載のマウス改変エピモルフィン。

【請求項14】 前記請求項1記載のエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を、エピモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物の血清から得られるエピモルフィンに対するポリクローナル抗体。

【請求項15】 前記請求項1記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体。

【請求項16】 前記請求項1記載のエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を、エピモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物から取り出した抗体産生細胞をミエロマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られる前記請求項15記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体。

【請求項17】 前記請求項3記載のマウスエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を、ラットに免疫し、そのラットから取り出した抗体産生細胞をミエロマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られる、前記請求項16記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体。

【請求項18】 前記請求項15記載のエピモルフィンに対するモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的精製方法で、エピモルフィンを精製することを特徴とするエピモルフィンの精製法。

【請求項19】 前記請求項14又は15記載のエピモルフィンに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定方法で、エピモルフィンを検出することを特徴とするエピモルフィンの検出法。

【発明の詳細な説明】

# \*【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、少なくともマウスからヒトに至る哺乳動物の皮膚、肺、腸等の間充織組織に広く存在し、上皮組織の形態形成に必須な生理活性物質（本発明者らは、これをエピモルフィンと命名した）に関するものであり、更に詳しくは、当該生理活性物質エピモルフィン、エピモルフィンの改変体、エピモルフィンをコードする遺伝子、エピモルフィンに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体、及び当該抗体を利用したエピモルフィンの精製、検出法に関するものである。本発明は、上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒法の開発等に有用な手段を提供するものである。

# 【0002】

【従来の技術】 上皮の正常な組織化、形態形成は、間充織のなんらかの制御を受けていることから、また、上皮形態の異常に起因する疾患の多くは、そのまわりに存在する間充織が原因となることから、古くから、間充織が上皮の形態形成を支持するメカニズムについての研究がなされている。しかしながら、実際に、上皮の形態形成を制御する分子の単離、精製及びその構造解析についての研究は、研究対象が複雑な系の中で時間的、空間的な制御を受けて発現する物質のために、単純化された培養系での実験が難しく、未だ大きな進展は見られていない。

【0003】 上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発等を実現するためには、間充織細胞が作る上記のような上皮形態を制御する作用を有する分子、すなわち当該作用を有する生理活性物質の単離、精製及びその構造の解明等が、不可欠の前提であり、当該生理活性物質の単離、精製及び当該物質の構造の解明等を早期に達成する事が、当該分野における重要課題となっていた。

# 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明者らは、このような課題を解決することを目標として、まず、形態形成の盛んに行われている実験動物マウスの胎児皮膚組織を用いて、生体内と同様な形態形成が行われ得る生体外培養実験系を確立した。この技術の特徴は、生体から取り出した細胞を上皮細胞と間充織細胞に分離した後、従来であれば間充織細胞の単層培養を行ってその生成物を調べる方法がとられていたのに対し、分離さ

\* 50

れた間充細胞を集塊状にして培養する点にある。

【0005】本発明者らは、この培養方法を用いてマウス胎児皮膚から分離した上皮が集塊状の間充細胞と接触した時にのみ生体外でも正常な形態形成を行うことを見出した。そこで、この集塊状の間充細胞が作り出す、上皮の形態形成を支持する物質を調べるため、集塊状で培養した間充細胞を免疫原としてラットに免疫し、得られたマウス間充細胞に対するラットのモノクローナル抗体のうちから、マウス間充細胞に結合することにより上皮の形態形成を阻害する作用を有する抗体を選び出した。

【0006】次に、本発明者らは、この抗体を用いて、この抗体が結合する物質、すなわち間充細胞成分中に存在し上皮の形態形成を支持する新規な物質を探索した結果、目的とする前記作用を有する新規生理活性物質を見出し、更に、その物質（マウスエピモルフィン）を単離し、当該物質の構造、すなわちその遺伝子配列とアミノ酸配列を明らかにすることに始めて成功した。更に、本発明者らは、得られた遺伝子を用いて、マウスエピモルフィンの他のアイソフォーム2種、及び、それぞれに対応するヒトエピモルフィンとそのアイソフォーム2種を同定することに成功した。

【0007】更には、上記で得られた遺伝子を適当な発現ベクターに組み込んだ後、動物細胞もしくは大腸菌に導入して発現させることにより、エピモルフィンを人工的に作ることが可能になった。これらの生成物は、いずれも、上皮とエピモルフィンを作ることでできない間充細胞株の組合せ培養実験に加えることにより、正常な上皮の形態形成を行わせる作用を有するものであることが分かった。すなわち、本発明者らは、その生成物の解析から、エピモルフィンを作る能力をほとんど失っていることが明らかな間充細胞株と胎児の上皮組織の組合せ培養では、上皮の正常な形態形成が見られないという事実と、この間充細胞株にエピモルフィン遺伝子を導入して強制発現させるか、あるいは、この培養実験の培養液中にエピモルフィンを加えることにより、正常な上皮の形態形成が行われるようになるという事実から、当該生成物が、前記上皮の形態形成作用を有するものであることを確認した。

【0008】また、ポリペプチドのカルボキシ末端に疎水性のアミノ酸配列を持つ細胞膜結合型のエピモルフィンについては、細胞膜結合部分である疎水性蛋白質部分を含むカルボキシ末端から、5分の1程度までのポリペプチドを取り除くか、あるいは、非疎水性ポリペプチドに置換することにより、可溶性の、すなわち、培養動物細胞から培養液中に分泌され、かつ精製分離の容易な形態の、改変エピモルフィンを作ること成功した。これらの改変エピモルフィンは、アイソフォームを含めた3種に共通するアミノ酸配列で構成されており、得られた改変エピモルフィンは、高い可溶性を有し、かつ天然の

エピモルフィンと同様に、正常な上皮の形態形成を行わせる作用を有するものであることが分かった。

【0009】更に、本発明者らは、上記方法で得られたエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を用いて、当該エピモルフィンが由来する動物種と異なるウサギ、ラット、マウス等の動物に免疫し、前記エピモルフィンに特に強く結合する作用を有するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を得ることに成功した。

【0010】このような結果として、本発明者らは、上皮の形態形成作用を有し、上皮の形態形成に必須な分子である新規生理活性物質エピモルフィン、及び当該エピモルフィンをコードする遺伝子を同定し、更に、遺伝子組換え技術を利用して、当該遺伝子を動物細胞もしくは大腸菌に導入して発現させることにより前記エピモルフィンを製造し、また、当該エピモルフィンと同等の作用を有し、かつ高い可溶性を有する改変エピモルフィンを製造する技術を確認した。そして、これらの物質を用いて、当該エピモルフィンに特に強く結合する作用を有し、当該エピモルフィンの発現調査や精製に利用し得るポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の製造を完成し、更に、これらの物質が、上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒法の開発等に有用な材料であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明の目的は、少なくともマウスからヒトに至る哺乳動物の皮膚、肺、腸等の間充細胞に存在し、下記の式（1）の塩基配列と相補的な塩基配列で構成される遺伝子プローブとハイブリダイズする遺伝子によって発現され得る新規生理活性物質エピモルフィンを提供することである。

式（1）

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【0012】また、本発明の目的は、アミノ末端のアミノ酸残基の構造が、下記の式（2）のとおりである前記の新規生理活性物質エピモルフィンを提供することである。

式（2）

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【0013】また、本発明の目的は、ヒト由来の間充細胞が作る、後記式（3）、（4）、又は（5）のアミノ酸配列で表される上皮の形態形成に必須な新規生理活性物質ヒトエピモルフィン、及び当該ヒトエピモルフィンのアイソフォームを提供することである。ここで、後記の、式（3）は、ヒトエピモルフィンのアミノ酸配列を、式（4）は、別のヒトエピモルフィン（アイソフォームA）のアミノ酸配列を、そして、式（5）は、別のヒトエピモルフィン（アイソフォームB）のアミノ酸配列を、それぞれ、示す。

【0014】また、本発明の目的は、前記ヒトエピモル

フィン、及び当該ヒトエピモルフィンのアイソフォームをコードする、後記式(6)、(7)、又は(8)の塩基配列で表される遺伝子を提供することである。ここで、後記の、式(6)は、ヒトエピモルフィンをコードする遺伝子の塩基配列を、式(7)は、別のヒトエピモルフィン(アイソフォームA)をコードする遺伝子の塩基配列を、そして、式(8)は、別のヒトエピモルフィン(アイソフォームB)をコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、示す。

【0015】また、本発明の目的は、マウス由来の間充組織細胞が作る、後記式(9)、(10)、又は(11)のアミノ酸配列で表される上皮の形態形成に必須な新規生理活性物質マウスエピモルフィン、及び当該マウスエピモルフィンのアイソフォームを提供することである。ここで、後記の、式(9)は、マウスエピモルフィンのアミノ酸配列を、式(10)は、別のマウスエピモルフィン(アイソフォームA)のアミノ酸配列を、そして、式(11)は、別のマウスエピモルフィン(アイソフォームB)のアミノ酸配列を、それぞれ、示す。

【0016】また、本発明の目的は、前記マウスエピモルフィン、及び当該マウスエピモルフィンのアイソフォームをコードする、後記式(12)、(13)、又は(14)の塩基配列で表される遺伝子を提供することである。ここで、後記の、式(12)は、マウスエピモルフィンをコードする遺伝子の塩基配列を、式(13)は、別のマウスエピモルフィン(アイソフォームA)をコードする遺伝子の塩基配列を、そして、式(14)は、別のマウスエピモルフィン(アイソフォームB)をコードする遺伝子の塩基配列を、それぞれ、示す。

【0017】また、本発明の目的は、前記エピモルフィンのポリペプチドのカルボキシ末端疎水性部分を、欠損もしくは非疎水性ポリペプチドに置換した、改変エピモルフィンを提供することである。

【0018】また、本発明の目的は、前記ヒトエピモルフィン、及び当該ヒトエピモルフィンのアイソフォームのカルボキシ末端の疎水性アミノ酸配列を含む部分を取り除くか、もしくは非疎水性ポリペプチドに置換することにより改変した、可溶性の、改変ヒトエピモルフィン、及び当該改変ヒトエピモルフィンのアイソフォームを提供することである。

【0019】また、本発明の目的は、前記マウスエピモルフィン、及び当該マウスエピモルフィンのアイソフォームのカルボキシ末端の疎水性アミノ酸配列を含む部分を取り除くか、もしくは非疎水性ポリペプチドに置換することにより改変した、可溶性の、改変マウスエピモルフィン、及び当該改変マウスエピモルフィンのアイソフォームを提供することである。

【0020】また、本発明の目的は、前記エピモルフィンの完全体もしくはその一部を、エピモルフィンが由来 \*

式(3)

\* する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物の血清から得られるエピモルフィンに対するポリクローナル抗体を提供することである。

【0021】また、本発明の目的は、前記エピモルフィンに対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0022】また、本発明の目的は、前記エピモルフィンの完全体もしくはその一部を、エピモルフィンが由来する動物種と異なる種の動物に免疫し、その動物から取り出した抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られるエピモルフィンに対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0023】また、本発明の目的は、前記マウスモルフィンの完全体もしくはその一部を、ラットに免疫し、そのラットから取り出した抗体産生細胞を、ミエローマ細胞と融合することにより形成したハイブリドーマより得られるエピモルフィンに対するモノクローナル抗体を提供することである。

【0024】また、本発明の目的は、前記エピモルフィンに対するモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的精製方法で、各エピモルフィン及び各エピモルフィンのアイソフォームを精製する方法を提供することである。

【0025】また、本発明の目的は、前記エピモルフィンに対するポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を用いて、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定方法で、各エピモルフィン及び各エピモルフィンのアイソフォームを検出する方法を提供することである。

【0026】更に、本発明の目的は、上皮の形態形成に必須な新規生理活性物質である前記エピモルフィン及びエピモルフィンのアイソフォーム(アイソフォームA、及びアイソフォームB)、前記エピモルフィンの改変体及びエピモルフィンのアイソフォームの改変体、前記エピモルフィン及びエピモルフィンのアイソフォームに特に強く結合するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体等、上皮形態の異常に起因する疾患の発症機序の解明、ならびにそれらの疾患の診断法、治療法の開発、あるいは新たな創傷治癒法の開発等に有用な材料を提供することである。

【0027】

【課題を解決するための手段】以下に、本発明の前記エピモルフィンのアミノ酸配列、及び当該エピモルフィンをコードする遺伝子の塩基配列の具体的な配列構造を示す。なお、下記の式(3)～(14)は、特許請求の範囲の請求項7～10の式(3)～(14)に、それぞれ、対応するものである。

【0028】以下の式(3)は、ヒトエピモルフィンのアミノ酸配列を示す。

【0029】以下の式（4）は、別のヒトエピモルフィ \* \* N（アイソフォームA）のアミノ酸配列を示す。

Met	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Asn	Asp	Asp	
				5					10					15		
Gly	Asp	Thr	Val	Val	Val	Val	Glu	Lys	Asp	His	Phe	Met	Asp	Asp	Phe	
				20					25					30		
Phe	His	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	
				35					40					45		
Tyr	Val	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Asn	His	Ser	Ile	Ile	Leu	Ser	Ala	Pro	
				50					55					60		
Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	
				65					70					75		
Ile	Lys	Lys	Thr	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Ala	Lys	Leu	Lys	Ala	Ile	Glu	
				85					5090					95		

23

24

Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205  
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser  
 275 280 285

【0030】以下の式(5)は、また別のヒトエピモル \* \*フィン(アイソフォームB)のアミノ酸配列を示す。

式(5)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp  
 5 10 15  
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe  
 20 25 30  
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln  
 35 40 45  
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu  
 85 90 95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190

25 26

Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile

195 200 205

Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

210 215 220

Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr

225 230 235 240

Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr

245 250 255

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro

260 265 270

Arg Ala Ile Tyr Pro

275

【0031】以下の式(6)は、ヒトエピモルフィンを \* \* コードする遺伝子の配列を示す。

式(6)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16

GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32

TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48

TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64

AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80

ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96

CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112

CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128

GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144

AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160

GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176

ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192

GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208

CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224

CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240

GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256

CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGG ATA ATT ATT GCT GTG TCA GTG 272

GTT CTG GTT GTC ATA ATC GTT CTA ATT ATT GGC TTG TCA GTT GGC AAA 288

TGA 289

【0032】以下の式(7)は、別のヒトエピモルフィンを \* \* コードする遺伝子の配列を示す。

式(7)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16

GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32

TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48

TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64

AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80

ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96

CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112

CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128

GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144

AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160

GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176

ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192

GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208

CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224

27

28

CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240  
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256  
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA TTG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA ATT 272  
 GTT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG 288

【0033】以下の式(8)は、また別のヒトエビモル \* を示す。

フィン (アイソフォームB) をコードする遺伝子の配列 \*

式(8)

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16  
 GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32  
 TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48  
 TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64  
 AAC CGG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80  
 ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96  
 CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112  
 CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA 128  
 GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC 144  
 AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA 160  
 GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC 176  
 ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT 192  
 GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC 208  
 CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT 224  
 CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA 240  
 GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT 256  
 CAG AGC AAG GCA AGA AGG CAA CAA CAT TGT CAT AGC AAC CAT ATC CCA 272  
 AGA GCC ATT TAT CCT TGA 278

【0034】以下の式(9)は、マウスエビモルフィン ※ ※のミノ酸配列を示す。

式(9)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu



29 180 185 190 30

Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala  
 260 265 270  
 Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu ser Val Gly  
 275 280 285  
 Lys

【0035】以下の式(10)は、別のマウスエピモル \* \*フィン(アイソフォームA)のアミノ酸配列を示す。

式(10)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val  
 260 265 270

31

32

Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser  
 275 280 285

【0036】以下の式(11)は、また別のマウスエピ  
 モルフィン(アイソフォームB)のアミノ酸配列を示す。

式(11)

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn Arg Thr  
 260 265 270  
 Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg

275

※ンをコードする遺伝子の配列を示す。

【0037】以下の式(12)は、マウスエピモルフィ ※

式(12)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT50GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112

33

34

CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 272  
 GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 288  
 AAA TGA 290

【0038】以下の式(13)は、別のマウスエビモル \* を示す。  
 フィン (アイソフォームA) をコードする遺伝子の配列 \*

式(13)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAG GTG ATG TTC GTC CTC ATT TGT GTA 272  
 GTC ACT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATT CTC GCA ACA GCA TTG TCA 288  
 TAG 289

【0039】以下の式(14)は、また別のマウスエビ ※ 配列を示す。  
 モルフィン (アイソフォームB) をコードする遺伝子の ※

式(14)

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208

35

ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG CAA CAG CAT TGT CAT AGC AAC CGT ACC 272  
 CCA AGA GCT CTT TGT CCT CGG TGA 280

【0040】以下、本発明について更に詳述する。本発明のエピモルフィンは、277ないし289個のアミノ酸からなる蛋白質をコア蛋白質とし、間充細胞により合成される物質であり、動物細胞内では修飾されて、マウスの細胞内では、約150kダルトン、ヒトの細胞内では、約70kダルトン（ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法による）の分子量になる。遺伝子のスプライシングにより、少なくとも3種類のタイプが存在し、そのうちの1種類（エピモルフィンアイソフォームB）は、分泌型であるが、他の2種類（エピモルフィン、エピモルフィンアイソフォームA）は、20ないし30アミノ酸残基の疎水性蛋白質の配列をカルボキシ末端に有しているため細胞膜に結合する性質を有する。

【0041】これらの分子は、間充織に存在して、上皮の形態を制御する重要な機能を有する。このことは、皮膚、小腸、肺等の器官培養に、本発明を完成するのに用いたエピモルフィンの機能を阻害する抗体を加えた実験や、そして、エピモルフィンを作る能力の低下した間充細胞と上皮組織の組合せ培養実験において、エピモルフィンが機能しない場合は正常な組織形成が行われないという事実から、確認できる。更には、このことは、上記の培養実験において、エピモルフィンを添加すると、上皮の正常な組織形成能が回復するという事実からも、確認できる。

【0042】エピモルフィンは、抗体を用いた組織染色により、特に胎児発生時、及び組織再生時に、組織形成が進行中の上皮と間充織の境界、もしくはその近傍の間充織内に、あるいは上皮の分裂が旺盛な部分の近傍の間充織内に、強く発現することが分かった。例えば、胎児発生期、及び再生時の皮膚組織においては、エピモルフィンは、真皮と表皮の境界部分や毛包形成を誘導すると考えられる未熟毛包先端部近くの間充織に、強く発現する。また、胎児発生期の小腸や肺においては、エピモルフィンは、管腔形成や分枝の行われている上皮に接する間充織で、強く発現する。

【0043】このように、エピモルフィンは、組織形成が行われる時に、組織形成が行われている上皮の近くの間充織内で、強く発現するが、しかし、エピモルフィンは、間充細胞でのみ作られており、エピモルフィンは、その時の上皮細胞内においては作られていない。

【0044】また、マウスのエピモルフィンと、ヒトのエピモルフィンは、アミノ酸レベルで約90%の相同性があり、動物種が異なっても良く保存されている分子であることが分かった。

36

\*【0045】更に、本発明者らが見出したエピモルフィン分子群は、いずれも、下記の式（2）で表されるアミノ酸配列をアミノ末端に共通して有しており、そのアミノ末端アミノ酸配列は既知の生体由来蛋白質のそれとは異なることが分かった。

式（2）

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

【0046】また、このエピモルフィン分子群に共通するアミノ末端アミノ酸配列部分は、その部分をコードする遺伝子レベルにおいても、下記の式（1）で表される塩基配列と同一もしくはほとんど同一の塩基配列を有しているため、式（1）で表される塩基配列の相補鎖をプローブとして、エピモルフィン分子群をコードするすべての遺伝子を検出、同定できることが分かった。

20 式（1）

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

【0047】本発明のエピモルフィンは、広く動物の間充細胞から得ることができるが、本発明においては、かかるエピモルフィンの活性を損なわない範囲で、単にその一部のアミノ酸を除去、挿入、修飾あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明のエピモルフィンに包含されることは言うまでもない。

【0048】また、エピモルフィンをコードする遺伝子も、同じアミノ酸をコードする他の塩基配列への置き換えはもとより、コードされるエピモルフィンが、活性を損なわない範囲で、単にその一部の塩基を除去、挿入、あるいは追加する等の改変を行ったものも、本発明のエピモルフィンをコードする遺伝子に包含される。尚、本明細書においては、塩基配列については、相補的な塩基配列を省略し、1本鎖のみを記載した。

【0049】本発明の、エピモルフィン及びそれをコードする遺伝子のDNA断片は、例えば、以下の様な方法によって得ることができる。

【0050】（mRNAの調製）まず、皮膚、小腸、肺、胎盤、へその緒等の結合組織を、あるいは間充織由来の培養株化細胞を、グアニジウムチオシアネート等の水溶液中でホモジナイズし、そして、Chirgwinらの方法[Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)]に従って、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法、あるいは蔗糖密度勾配遠心法によって、全RNAを沈澱として分離する。

【0051】分離後、フェノール抽出、エタノール沈澱により、全RNAを精製し、これをオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィにかけて精製して、目的のエピモルフィンのmRNAを含むポリ(A)含有mR

\* 50

NA [poly (A) mRNA] を単離し、mRNA群を得る。蔗糖密度勾配遠心法によって、更に、これらのmRNA群を精製し、目的とするエピモルフィンのmRNAの含量を高めて、遺伝子を得る可能性を高める。

【0052】このmRNA群を原料として使用し、以下に詳述する通り、Huynhらが報告している方法 [DNA Cloning, IRL Press, 49-78 (1984)] に従って、cDNAライブラリーを作成し、次に、本発明者等が、動物に間充細胞を免疫することにより得た、主としてエピモルフィンの活性を阻害する効果を有することによりエピモルフィンに反応することを確認できた抗エピモルフィンモノクローナル抗体を用いて、Youngらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194 (1983)] に従って、cDNAの翻訳産物と抗体の結合の有無により、エピモルフィンをコードする遺伝子を同定、単離する。

【0053】(第1段階) 上記で調製したmRNA群と、例えば、オリゴ(dT)プライマー等のプライマーDNAとをハイブリダイズさせ、逆転写酵素、及びDNAポリメラーゼIを用い、Gublerらの方法 [Gene, 25, 263 (1983)] に従い、2本鎖cDNAを合成する。

【0054】(第2段階) 次いで、得られたcDNA鎖の両端に、EcoRI等の酵素切断サイトを片端に持つアダプターを付加する。

【0055】(第3段階) 上記のcDNA鎖を発現可能なプロモーターを有する、例えば、 $\lambda$ gt11などの $\lambda$ ファージベクター、又はプラスミドベクターのEcoRI切断部位等に挿入して、組換え $\lambda$ ファージDNA群又は組換えプラスミドDNA群を得る。

【0056】(第4段階) 上記で得られた組換え $\lambda$ ファージDNA群を材料とし、市販の、例えば、ギガパックIIゴールド(Statagene社)などのイン・ビトロ・パッケージング・キットを、説明書に従い使用し、いわゆるイン・ビトロ・パッケージングを行い、組換え $\lambda$ ファージDNAを有する $\lambda$ ファージ粒子を得ることが出来る。得られた $\lambda$ ファージ粒子を、常法に従い、宿主、例えば大腸菌に感染導入し、 $\lambda$ ファージ粒子を増殖させる。また、組換えプラスミドDNA群では、常法に従い、宿主、例えば大腸菌を形質転換し、増殖させる。

【0057】(第5段階) 適当な試薬、例えば、lacプロモーターを有するベクターの場合イソプロピル $\beta$ チオガラクトピラノシド(IPTG)などを用いて、菌に挿入したDNAの産物を含む蛋白質を合成させ、それを、ニトロセルロース等の膜に吸着させた後、抗エピモルフィン抗体を用いて、常法により、エピモルフィンの一部を合成しているクローンを同定する。エピモルフィンをコードするcDNAの一部を得た後では、そのcDNA

の一部をプローブとして使用し、例えば、以下のような方法により、エピモルフィンの非翻訳領域を含む全長cDNAはもとより、他の動物種のエピモルフィンをコードするcDNA等を、容易に単離することができる。すなわち、同定したい動物種の結合組織を用いて、上記(mRNAの調製)から(第4段階)までは、上記と同じ操作を行い、第5段階を、次の通りに行う。

【0058】(第5段階) 適当な核酸結合能を有する膜、例えば、ナイロン膜にDNAを移しとり、アルカリ等で変性させ、予め放射性物質等でラベルした入手済みのエピモルフィン遺伝子をプローブとして使用し、ハイブリダイズさせることにより、目的のエピモルフィン遺伝子の全長もしくは一部が組込まれているクローンを同定する。

【0059】得られたエピモルフィンをコードするcDNAを用いて、他の動物種のエピモルフィンをコードするcDNA等を単離する別の方法として、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)法 [Methods Enzymol., 155, 335-350 (1987)] がある。

【0060】すなわち、エピモルフィンの遺伝子は、動物種間の相同性(ホモロジー)が高いので、エピモルフィンの非翻訳領域も含めたcDNAの塩基配列中で、他の物質との相同性が低い部分を未同定エピモルフィン遺伝子を増幅させる開始部分として選び、間充細胞から精製、調製したcDNA群に加え、ポリメラーゼで相補鎖を増幅させることにより、相同性の高い遺伝子として、エピモルフィンのアイソフォームや他の動物種のエピモルフィンをコードするcDNAを得ることも可能である。

【0061】かくして得られるcDNAの発現は、例えば、トランジェントなin vitroの蛋白翻訳系、具体的には、Nature, 329, 836-838

(1987)に記載されているような、アフリカツメガエルの卵母細胞内での翻訳系、あるいは、該DNAをpUC19等のプラスミドのプロモーターの下流に翻訳開始コドンATGとフェーズを合わせて接続した蛋白質発現用プラスミドを導入した大腸菌、株化動物細胞などの宿主内で行う翻訳系等、を用いて行うことができる。次いで、常法に従い、例えば、抗エピモルフィン抗体を結合させたアフィニティカラムを用いて発現された蛋白質を回収することにより、本発明のエピモルフィンを得ることができる。

【0062】天然のエピモルフィンと同等の機能を有し、可溶性で、取扱の容易な改変エピモルフィン得る方法については、エピモルフィン分子自体を生化学的手法を用いて切断してもよいが、特に、エピモルフィンをコードする遺伝子を改変し、これを用いて、改変エピモルフィンを得る方法が好適に用いられる。この場合の具体的な手法は、特に限定されないが、例えば、疎水領域を

コードする配列を制限酵素等で切断、削除することもできるし、また、連続した疎水性アミノ酸が正しく翻訳されないよう、この翻訳領域上流からフレームシフトを起こさせることもできる。

【0063】特に、疎水性アミノ酸配列を含む部分を非疎水性アミノ酸配列に置換する場合は、疎水性アミノ酸配列を含む部分をコードする遺伝子を削除後、所望の非疎水性アミノ酸配列をコードする遺伝子を削除部分につなぎ込めば、容易に目的の改変エピモルフィンにコードする遺伝子が得られる。すなわち、前述の各種方法により単離されたcDNAを、動物細胞発現ベクター等に組み込み、次に、適当な制限酵素による消化、末端平滑化、再連結の操作により、エピモルフィンのC末端疎水領域をコードする部分を欠損もしくは非疎水性アミノ酸配列をコードする遺伝子に置換することができる。

【0064】適当なベクターに連結された改変させたエピモルフィン遺伝子は、大腸菌又は動物細胞等に導入され、これらの宿主を適当な条件で培養して、導入遺伝子を発現させることにより、改変エピモルフィンが得られる。前者では、菌のライセート上清から、改変エピモルフィンポリペプチドが回収される。また、後者では、培養上清から、改変エピモルフィンが回収されるが、これらの回収方法については、種々の方法、例えば、免疫アフィニティクロマトグラフィを用いた方法等を、好適に利用することができる。

【0065】かくして得られる可溶性の改変エピモルフィンもしくは改変エピモルフィンポリペプチドは、生理的な溶液に容易に溶解できる特性を有しているので、容易に大量生産及び精製が可能であり、そして、種々の用途、例えば、上皮の形態異常の原因解明や、その診断、治療等に、そのまま使用できる利点がある。

【0066】上述の各種方法で得られたエピモルフィンもしくはその改変体の製造、ないしは精製工程は、極めて膨大、かつ複雑であり、その収量の低さからも、実際の研究開発、応用開発への材料提供に大きな問題を残している。更に、エピモルフィンの測定は、バイオアッセイ（生物学的検定法）による上皮組織の形態変化を促す活性量としての測定方法では、操作性、及び精度に劣ることはもとより、常に測定値（活性）に干渉する成分の存在を考慮する必要がある。

【0067】上記の各種方法で得られたエピモルフィンを用いて、それらに特異的に結合する新規なポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を得ることにより、これらの問題を解決することができる。すなわち、本発明のポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体を利用することにより、抗原抗体反応を利用したエピモルフィンの免疫学的精製手段、ならびにエピモルフィンの免疫学的測定手段等が提供される。本発明のポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体は、エピモルフィンに特異的な結合性を有することをその最大の特徴と

しており、そして、かかる抗体には、エピモルフィンの活性を阻害しない、ないしは阻害するタイプの抗体が含まれる。また、本発明のポリクローナル抗体には、抗エピモルフィン抗血清も含まれる。

【0068】エピモルフィンに対するポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体は、前述の各種方法で得られたエピモルフィンの完全体もしくはその一部分を免疫抗原として使用して、通常の抗体の製造方法に準じて製造することができる。当該免疫抗原としてのエピモルフィンは、その完全体に限らず、その適宜の一部分を使用することができる。但し、本発明の抗体の製造においては、必ずしもエピモルフィンの精製標品を用いる必要はなく、これを含む細胞や組織などの粗精製品を使用することも可能である。

【0069】本発明のポリクローナル抗体製造方法は、より具体的には、上記免疫抗原を、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヤギ等の哺乳動物に免疫し、以降、部分採血した血清中に、免疫抗原に強く結合する抗体群が検出されるまで、同様の免疫操作を繰り返す。免疫に用いる動物種は、免疫抗原の由来する動物種とは異なる動物種を用いる限りにおいては、特に限定されない。免疫は、一般的方法により、例えば、上記免疫抗原を哺乳動物に静脈内投与、皮下注射もしくは腹腔内注射等の方法により投与することにより行われる。

【0070】より具体的には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）等で適当量に希釈、懸濁した免疫抗原を、所望により、免疫賦活剤として、通常のアジュバントを併用して、動物に、2～21日毎に数回投与し、総投与量が、約100～500マイクログラム／動物程度になるようにするのが好ましい。

【0071】免疫感作後の動物から血液を採取し、血清成分を分離して、目的の抗血清、すなわち未精製のポリクローナル抗体を得ることができる。更に、得られた抗血清を、透析、濃硫酸アンモニウム液での塩析出、ゲル濾過法、抗免疫グロブリン抗体結合アフィニティクロマトグラフィ等の従来の技術を用いて、抗体成分を精製し、目的のポリクローナル抗体を得ることができる。更に、精製された免疫抗原を用いた免疫アフィニティクロマトグラフィにより、ポリクローナル抗体の反応特性を高めることができる。

【0072】本発明のモノクローナル抗体製造方法は、より具体的には、上記のエピモルフィンに対するポリクローナルを得る方法と同様にして、哺乳動物を免疫感作し、その動物から採取した抗体産生細胞を、哺乳動物のミエローマ細胞と融合させて融合細胞（ハイブリドーマ）群を作成し、これらより、免疫抗原を認識する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを選択し、該クローン化されたハイブリドーマにより、目的とするモノクローナル抗体を産生させることにより得られる。

【0073】用いる免疫感作動物種は、細胞融合に使用

するミエローマ細胞との適合性を考慮して、選択するのが好ましく、一般には、アルメニアンハムスター、マウス、ラット等が有利に使用される。実験目的での使用頻度が高いマウス由来のエピモルフィンの場合、近縁種のラットを免疫感作動物として用いても、目的のモノクローナル抗体を得ることができる。抗体産生細胞としては、免疫抗原の最終免疫の約3日後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

【0074】上記抗体産生細胞と融合されるミエローマ細胞としては、既に、公知の種々の細胞株、例えば、P3×63Ag8(ATCC TIB 9)、P3×63Ag8.U.1(ATCC CRL 1597)、P3/NSI/1-Ag4-1(ATCC TIB 18)、Sp2/0-Ag14(ATCC CRL 1581)、FO(ATCC CRL 1646)、P3×63Ag8.653(ATCC CRL 1580)、S194/5.XXO.BU.1(ATCC TIB 20)等や、ラットにおけるYB2/0(ATCC CRL 1662)等が使用される。

【0075】上記抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合反応は、基本的には、公知の方法、例えば、ミルスタインら(Milstein et al.)の方法[Methods Enzymol., 73, 3-46(1981)]等に準じて行い得る。より具体的には、上記融合反応は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で行われる。融合促進剤としては、通常用いられるもの、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等が使用され、更に、所望により、融合効率を高めるために、ジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

【0076】抗体産生細胞とミエローマ細胞との使用数比は、通常の方法と変わりがなく、例えば、ミエローマ細胞に対し、免疫細胞を約1~10倍程度用いればよい。上記融合時の培地としては、例えば、上記ミエローマ細胞の増殖に使用される如きRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の各種培地を利用でき、通常は、牛胎児血清等の血清補液を抜いておくのがよい。

【0077】融合は、上記抗体産生細胞とミエローマ細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000~6000程度のPEGを、通常培地に、約30~60%(W/V)の濃度で加えて、混ぜ合わせるにより行われる。以後、適当な培地を逐次添加して、遠心し、上清を除去する操作を繰返すことにより、所望のハイブリドーマが形成される。

【0078】得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えば、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養することにより行われる。該HAT培地での培養は、ハイ

ブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間、行えばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索及び単クローン化が行われる。

【0079】該産生株の検索は、例えば、ELISA(enzyme-linked immunosolvent assay)法などの、一般に抗体の検出に用いられている種々の方法[「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」(株)R&Dプランニング発行、p30~53、昭和57年3月5日]に従って行われる。すなわち、固相に塗布された免疫抗原に、クローン化されたハイブリドーマの培養上清、及び酵素を標識された免疫に用いた動物種の免疫グロブリンに対する抗体を、順次、加えては、洗浄し、最後に、標識された酵素により、発色反応を起こす基質液を加えて、発色度を調べるにより、クローン化されたハイブリドーマの培養上清に含まれるモノクローナル抗体の免疫抗原への結合能を評価できる。尚、上記検索における抗原としては、精製免疫抗原を好ましく使用できる。

【0080】かくして得られる所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、血清を含む通常の培地で継代培養でき、また液体窒素中で長期間保存可能である。該ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って、培養し、その培養上清として、あるいは、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。更に、上記の方法により得られるモノクローナル抗体は、前述のポリクローナル抗体の精製と同様の操作で精製することができる。

【0081】かくして得られる本発明のポリクローナル抗体、及びモノクローナル抗体は、これを利用して、例えば、免疫沈降法、免疫アフィニティクロマトグラフィ、プロテインAカラム等の通常の免疫学的精製手段により、改変体を含むエピモルフィンを簡易、かつ特異的に精製できる。更に、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光抗体法等の通常の免疫学的測定手段により、高感度、高精度に、かつ高い特異性をもって、エピモルフィンを簡易に測定、検出することができる。

【0082】

【実施例】以下に実施例1~14を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。

【0083】1. マウスエピモルフィンに対するモノクローナル抗体の作製

a) 免疫抗原として、エピモルフィンを細胞膜表面に持つマウス胎児の真皮細胞を用いた。集塊状で培養した間

10

20

30

40

50

充細胞では、エピモルフィンが、作られて、上皮の形態形成を支持するが、これに対して、扁平な細胞形態をとる単層で培養した間充細胞では、エピモルフィンは、ほとんど作られず、上皮の形態形成が行われない、という本発明者らが見出した知見に基づいて、以下の1)~5)の手順で実験動物のICRマウス胎児5四分の皮膚組織から分離した間充細胞(真皮)細胞を、集塊状で4日間培養した後、ホモジナイズし、そして、生理食塩水に懸濁した。

【0084】1) 妊娠13日目のICRマウス(日本チャールリバー)より摘出したマウス胎児5四分の皮膚組織を手術用のハサミで切り取り、生理食塩水で洗浄した。

2) 1)で準備したマウス胎児皮膚組織を0.25%トリプシン、10mM CaCl<sub>2</sub>を含むHEPES-ハンクス液(pH7.4)中で、4℃条件下12時間インキュベートした後、20μg/mlのDNaseを加えてゆっくりとピペティングすることにより、シート状の表皮と単離された真皮細胞を得た。

【0085】3) 2)の細胞懸濁液を低速遠心分離することにより表皮と、上清中の真皮細胞を分離した。なお、この操作以降は10%の牛胎児血清を含む、ダルベッコ変法イーグル培地(DME)とハムF12培地の1:1混合培地(DH培地)を用いた。

【0086】4) 単離真皮細胞を培地で洗浄後、1000rpmで2分間遠心分離し、得られた真皮細胞のペレットからマイクロピペットを用いて100μlずつを吸引して、培地上に浮かべた多孔性ヌクレポアメンブレン(13mm径、8μm孔)上に乗せて集塊状で培養した。

5) 37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で4日間培養した上記真皮細胞を無血清培地中に懸濁し、洗浄後、生理食塩水中に分散したものを抗原として用いた。

【0087】この懸濁液に、等量のフロインド コンプリート アジュバント(Freund complete adjuvant, Difco Laboratories, Detroit Michigan USA)を加えて、よく混合したものを、Lewisラットに腹腔内投与した。更に、2週間、及び3週間後に、同液を同様にLewisラットに投与した。最終投与の3日後に、脾臓を摘出し、得られた脾細胞を、実施例13と同様の方法で、マウスミエローマ細胞株P3×63Ag8.U.1(ATCC CRL 1597)と細胞融合し、ハイブリドーマ群を得た。

【0088】得られたハイブリドーマ群を、後記の実施例13と同様の方法で、限界希釈法によりクローニングした後、エピモルフィンに結合する抗体を産生するハイブリドーマのクローンを、次の方法で選別した。すなわち、一次スクリーニングとして、集塊状で培養した間充細胞の溶解物と結合し、単層で培養した間充細胞の溶解物とは結合しないモノクローナル抗体を作るハイブ

リドーマを選別し、更に、二次スクリーニングとして、免疫原に用いたエピモルフィンを含むサンプルを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で流した時に特異的に出現する、分子量約150Kダルトンのエピモルフィンのバンドに反応するモノクローナル抗体を作るハイブリドーマを、Western blot法により、モノクローナル抗体(ハイブリドーマの培養上清)と放射性物質をラベルした抗ラット免疫グロブリン抗体を順次反応させて検出することにより選別した。スクリーニングの詳細は次のとおりである。

【0089】1) 一次スクリーニング: 集塊状で、もしくは、単層で10%牛胎児血清を含むDH培地で4日間培養したマウス胎児真皮細胞を、各々2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液中に溶解したものを、抗原としてドットプロット法で抗体反応を調べた。ドットプロットはバイオラッドラボラトリーズ社のBio-Dot blotterを用いて行い、ニトロセルロース膜上に上記抗原を吸着させた。同ニトロセルロース膜にハイブリドーマ培養上清、HRP (ホースラディッシュペロキシダーゼ) 標識抗ラット免疫グロブリン抗体(2次抗体)を順次反応させ、最後にジアミノベンチジンを含む基質液を加えて発色反応させて、集塊状培養の真皮細胞に対し陽性を示し、単層培養の真皮細胞に対し陰性を示す抗体を作るハイブリドーマを選別した。

【0090】2) 二次スクリーニング: Laemmliらの方法[Nature, 227, 680 (1970)]に従い、1)で用いた集塊状培養真皮細胞溶解液をSDS-PAGE用サンプル液に加え、5分間煮沸後、4~20%グラジエントゲルで電気泳動を行った。ウェスタンブロットはテフコ社(長野、日本)のModel T. C. 808を取扱説明書通りに使用して、ゲル中の蛋白質をニトロセルロース膜に移し取り、同ニトロセルロース膜にハイブリドーマ上清、<sup>125</sup>Iラベル抗ラット免疫グロブリン抗体を順次反応させた。分子量マーカーで150Kダルトンの位置のエピモルフィンのバンドが陽性になった抗体を作るハイブリドーマを選別した。かくして、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【0091】更に、これらのモノクローナル抗体のうち、器官培養系に加えると、上皮の構築を阻害するもの、すなわち、エピモルフィンの活性部位を認識するものを、下記の方法で選出し、このハイブリドーマをクローン12(clone 12)、モノクローナル抗体をMC-1(mAb 12と記することもある)と名付けた。すなわち、形態形成が活発に行われる時期(妊娠11日目の肺、13日目の皮膚、小腸)のマウス胎児組織の器官培養を、ICR妊娠マウスより無菌的に取り出したマウス胎児の組織切片を10%牛胎児血清を含むDH培地上に浮かべたヌクレポアメンブレン(13mm径、



8  $\mu$ m孔) 上に乗せて培養する方法で行った。そのうちの半分は培地中に、300マイクログラム/mlの下記b)に示す方法で精製したモノクローナル抗体存在下で行った。

【0092】対象として、モノクローナル抗体と同様の手法で精製したラットIgGを同濃度で培地に加えたものを同時に用いた。モノクローナル抗体MC-1 (mAb 12) を添加した器官培養3日目の組織切片を、図1に示す。コントロールでは、各臓器が上皮構造が正常に構築(肺胞形成、小腸ヒダの形成等)されているのに対し、MC-1 (mAb 12) の存在下、すなわち、エピモルフィンの活性を阻害した場合には、上皮組織が異常になっていることが判る。

【0093】b) 上記a) で得られたクローン12を、12%の牛胎児血清を含むダルベッコ変法MEMと、Ham F12の等量混合培地(DH)にて、5%炭酸ガスインキュベーター中で、37℃にて継代培養を行い、更に、細胞を無血清DHにて、2回洗浄後、無血清DH中で、1週間培養することで、MC-1 (mAb 12) を含む血清入りDH、及び無血清DHを、それぞれ、61得た。これらを、50%硫酸アンモニウムで塩析し、PBSで透析後、抗ラットIgGカラム(アメリカンコーレックス社)でアフィニティ精製を行った。抗体は、更に塩析後、DHで十分に透析を行い、約5mg/mlの精製品を得た。

【0094】2. マウスエピモルフィンcDNAの単離  
マウス胎児間充細胞から調製したmRNAを、オリゴ(dT)セルロースカラムにより精製し、これを出発材料として、 $\lambda$ gt11(アマシャム社)の系で、cDNAライブラリーを作成した。マウス胎児間充細胞は、ICR妊娠マウス(日本チャールスリバー社)からマウス胎児を摘出し、実施例1と同様の方法で、カルシウムの存在下でトリプシン消化を行って、間充細胞を単離後、集合塊にして培養したものを使用した。

【0095】mRNAの調整は次の様に行った。細胞を回収し、5.5Mグアニジウムチオシアネート(GTC)溶液中で、ポリロン型ホモジナイザーを用いて、細胞をホモジナイズした。遠沈管にセシウムトリフロ

\*アセテート(CsTFA)-0.1M EDTA液を入れ、その上に上記の溶液を重層し、23,000rpm、15℃で24時間遠心し、RNAのペレットを得た。次に、ペレットを4M GTC液に溶かし、10,000rpm、10分間の遠心で不溶物を除去した。上清に1M酢酸100 $\mu$ lとエタノール3mlを加え-20℃で3時間静置後、10,000rpm、20分間遠心し、得られたRNAのペレットをTE(Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM)液、少量に溶かした。

【0096】更に、1M Tris (pH9.0) 1/10倍量、5M NaCl 1/50倍量、10%SDS 1/20倍量、フェノール(0.1M Tris-HCl (pH9.0) 飽和) 1/2倍量、クロロホルム・イソアミルアルコール(24:1) 1/2倍量を加えて10分間振盪後、3000rpm、10分間冷却遠心し、水層を回収した。更に、等量のクロロホルム・イソアミルアルコールを加えて同様の操作を行った。最後に、3M酢酸ナトリウム1/10倍量、冷エタノール2.5倍量を加えて、混和後、-20℃で10時間静置し、15000rpm、10分間の遠心でRNAのペレットを得た。

【0097】 $\lambda$ gt11 DNAに組み込まれた該ライブラリーを、大腸菌Y1090(アマシャム社)に感染させ、該大腸菌をプレートに播いてプラークを形成させた後、IPTGをコートしたニトロセルロース膜でプレートを覆い、導入cDNAの産物と $\beta$ ガラクトシダーゼの融合蛋白を、当該大腸菌に合成させた。ニトロセルロースに吸着したcDNA産物のうち、実施例1で得られた抗エピモルフィン抗体により認識されるものを検索し、それに相当する $\lambda$ gt11のクローンを単離した。最後に、得られた $\lambda$ gt11から単離したエピモルフィンcDNA断片をプローブとして、 $\lambda$ gt11の系と同様の手法で合成した $\lambda$ gt10(アマシャム社)のcDNAライブラリーを、再度スクリーニングし、下記の式(15)で表される、エピモルフィンの全長をコードするcDNAを単離した。

【0098】

式(15)

```
GGGCGGGCGG GCTGTGCCGT GGCAGCGCCT GCCCGAGGGA GGGCGGGCGG GCGGGGCCAG 60
GACCCCGGCA GCAAGAGGCG GCGATCGGGC CACCGGAGAG TGTGCGGCGG GGCAGCTGAG 120
CGGCGGGTGC CCCGCCCTGC TGGCCGGTGG GGATGCGGGA CCGGCTGCCC GACCTCACGG 180
CGTGTAGGAC AAACGACGAT GGAGACACTG CTGTCGTCAT TGTGGAGAAG GATCATTTCA 240
TGGACGGTTT CTTCCATCAG GTAGAGGAGA TTCGAAGCAG CATAGCCAGG ATTGCTCAGC 300
ATGTAGAAGA CGTGAAGAAG AACCACAGCA TCATCCTGTC TGCTCCAAAC CCAGAAGGAA 360
AAATAAAAGA AGAGCTGGAG GACCTGGACA AAGAGATCAA GAAACTGCT AACAGGATCC 420
GGGGCAAGCT GAAGTCTATT GAGCAGAGCT GTGATCAGGA CGAGAATGGG AACCGAACTT 480
CAGTGGATCT GCGGATACGA AGGACCCAGC ACTCGGTGCT GTCACGGAAG TTTGTGGACG 540
TCATGACAGA ATACAATGAA GCGCAGATCC TGTTCGGGA GCGAAGCAAA GGCCGCATCC 600
AGCGCCAGCT GGAGATCACT GGGAGGACCA CCGCTGACGA CGAGCTGGAA GAGATGCTGG 660
```

47

48

AGAGCGGGAA GCCGTCCATC TTCATCTCGG ATATTATATC AGATTACAA ATCACTAGGC 720  
 AAGCTCTCAA TGAGATCGAG TCCCGCCACA AAGACATCAT GAAGCTGGAG ACCAGCATCC 780  
 GAGAGCTGCA CGAGATGTTT ATGGATATGG CCATGTTTGT CGAGACTCAG GGTGAAATGG 840  
 TCAACAACAT CGAGAGAAAT GTGGTGAAC TGTAGATTA CGTGAACAT GCCAAGGAAG 900  
 AGACGAAGAA AGCCATCAAA TACCAGAGCA AGGCCAGGCG GAAAAAGTGG ATAATTGCTG 960  
 CTGTGGCGGT GGCTGTCTT GCCGTCTCG CTCTAATCAT TGGCTTGTG GTTGGCAAAT 1020  
 GATTGCGTAG ATGGCGCTGG GTGCTTGCTT CTCCTCAGG GTGGCAAAGG TGATGTTCTG 1080  
 CCTCATTTGT GTAGTCACTT TGCTTGTGAT CCTTGAATT ATTCTCGCA CAGCATTGTC 1140  
 ATAGCAACCG TACCCCAAGA GCTCTTTGTC CTCGGTACT CCGACCATAC CTGCAGCTTA 1200  
 GTCAGCATCC TGTCTTCCA CGAGTGAACC TCAGACTCCA GGGCTAGCGC CGAGCACTGA 1260  
 GGTTTTTTATT GGTGATGAAG AAGAAAGCAC CGCAGAGGTT TCGTACCATG AAACACCGCG 1320  
 AGCCCCAGTG ATGCGACATG CCAGCCCAGA GAGCCTGGGT CTCTCTCAAG GACACCACAG 1380  
 AGATTTTACA ACAGTGGCCT TGCCTTGTA GCTTTGAAAT AGGAATGATT GAAAAAGCCT 1440  
 AATTTTAAA GACAATGTCA GTGTTAAAA TGTATGTTGT GTGTAATTAG GGTGTGCTCT 1500  
 GCGCTCAGCT GGCAGTCTG ACGAAGAGAC TTCGAGCCAG GCCTGATCTC GTTTCATGTC 1560  
 TTGTTTGAG AATCATCACA GAACTGTTTT GTAAGGCATC TGTAAGTTAA GTTCTTAA 1620  
 CTATTAACAT CTAAACTCCC TTTCTAAGCT AGACACTGCC TTGCGAAGGA CAATGGGCCA 1680  
 GCCCCGGCA AGCATGAACA CTGCCTTACA GCCCTCAGG GCCCTTCTAT AGTGCTTCT 1740  
 GGTGACCCCTG ACTAGGAAGT GTGAGGCTCT GAAGAGCCTT GAACGTTAGC TCACGGAGGG 1800  
 GACAAGCAGT CACATGCCGC ACTCATGTTA CTCTCCCTTG TTCATGTGAG CTGATGAAGT 1860  
 CTCAAGGCAA GCGGACAGTG ACGATGGACC AAACCTCGGTG CTCCTAAAC TCAAGAGAAT 1920  
 GGCCCCGAGT ACATAGCCAC TCCTGGATGG CACCTGAAGG ACCAGTCTCT CAGCCCAACA 1980  
 CCCACGAGTG CCCAGAGTTC CTAAGAAACC ATGAAGTGTG GGATAAAGCT GTGCACTGGT 2040  
 TTACACTTGT GAATAGATGG CCCAGCGACC AAGTATGTGA AGGATACCAT GACTAGTGAA 2100  
 CTCTGCCAAC TGCTGACTGT GATGAGTGCT CACTCTACCC CAGCCTCACT TGGTGGGATA 2160  
 TGACGTAGCC ATGCCGGGTC AGAACACCAA GTGTGAGCAA GTGCTACTGA ACTATCTAAA 2220  
 AACCATGATC CTTTCAGTGG TAAGTGTGCC AACTGTGAC CTCCTCACAC CTTCTGGTCT 2280  
 GACACCCCAT TGCCGAGAG CTAAGTGCAG AGGCTGGGCT GTGGGTCTCT GTCTAGAGTT 2340  
 AGCCTGTAGT GCAGCCACTC CTGGCTGATA GCTCACCCCT CCGCAACCGG GAGCTACCC 2400  
 TTCCTGCCTG GAAGCTCACA CTTCTGTCTT GGGAGCTCAC CCTTCTTGCC TGGGAGCTCA 2460  
 CACTTCCCGT CTGGGAGCTC AACTTCCCTT CCTGGGAGCT CACACTTCCT GCCTGGGAGC 2520  
 TCACCCCTCC CGCTGGGAG CTCACACTTC CTGCCTGGGA GCTCTGAAGA TGAACCTGGG 2580  
 CCTTTGCAGC TCACCTCTC TGCATCAGTC AGTGCCATCG GATTAGCTG CAGAGACCAT 2640  
 GCGTACCACC CAGGCTCCCA CCACCCACAG CCAGGTGTCC CTCCAGTCCA GCCTGAGCCC 2700  
 TTGGCCTGCA GTGTGCTCG AGAGCGCTCA GGAGACCTCT CGACCAGGCA GGCAGCTGAA 2760  
 TCTGGATTTC CAGTGAATCA GGGGTGTGTG GGTGACTGAG TCAGCACTCC AGATACATCT 2820  
 CTCTGCTGAC TTCATAGCCT ATTTAAAAAT ATATTTACAG ATTCCCTTGT TACCTTTTCC 2880  
 AAGCATTTCT TCAATATTTT TGTGTTTACA TTAAAAAGTT CTCAGAGATG CAAAAAATA 2940

【0099】式(15)のcDNA配列のうち、実際にアミノ酸に翻訳される領域は、153番目から1019番目までの塩基配列部分で、更に、終止コドン3塩基を追加した塩基配列は、前記式(12)に、このcDNAがコードする蛋白質は、前記式(9)に、それぞれ、対応する。

### 【0100】3. マウスエピモルフィンの精製

a) 実施例1で得られた精製モノクローナル抗体MC-1 (mAb 12) を、イソプロパノール、中性磷酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄したアフィゲル10 (パイオラッドラボラトリーズ社) と、5時間、4℃にて反応させ、固定した。IMエタノールアミンで未反応の官能

\* 基をブロックした後、PBS、DHにて十分洗浄して、40 MC-1 (mAb 12) 固定化アフィゲル10を調製した。

【0101】b) ICRマウス胎児 (妊娠17日目のもの) 30匹を、ホモジナイズ後、PBSにて洗浄し、20mMチャップス (ドータイト製) にて、エピモルフィンを含むものを抽出した。a) で調製したアフィゲル10を、カラムに注入し、抽出液を上から注いで、1晩、4℃でインキュベートした。PBSにてゲルを十分洗浄後、15mMの塩酸液を用いて、カラム吸着物を回収して、電気泳動を行ったところ、図2に示すように、エピモルフィンの精製品が得られた。

\* 50

【0102】4. 動物細胞内でのエピモルフィンの合成  
実施例2で得られたマウスエピモルフィンcDNAを、  
βアクチンのプロモーターを有する動物細胞発現ベク  
ターpβactCAT9 [Gene, 48, 1-11,  
(1986)] のHindIII-HpaI部位に組み  
込み、内在性のエピモルフィン活性のほとんどないNI  
H/3T3細胞(ATCC CRT 1658)に導入  
した。得られたトランスフェクタントは、無処理のNI  
H/3T3より数倍~数10倍多い量のエピモルフィン  
を発現していることが、確認できた(図3)。次いで、  
実施例3と同様の方法で、発現された蛋白質を回収し、  
マウスエピモルフィンを得た。

【0103】5. ヒトエピモルフィンcDNAの単離  
ヒト胎盤から調製したmRNAを、オリゴ(dT)セル  
ロースカラムにより精製し、これを出発材料として、λ  
gt10 (アマシャム社)の系で、常法[Huynh  
ら, 「DNA Cloning」, IRL Pres  
s, 49-78 (1984)]により、cDNAライ  
ブラリーを作成した。当該ライブラリーを、大腸菌NM5  
14 (アマシャム社)に感染させ、プレートに播種し  
た。

【0104】次に、12時間後、ナイロン膜をプレート  
にかぶせてDNAを移しとり、0.5M-NaOHでD  
NAを変性させて、<sup>32</sup>Pでラベルした実施例2で得られ  
たマウスエピモルフィン遺伝子の翻訳領域をプローブと  
して使用し、ヒトエピモルフィン遺伝子の断片を含むク  
ロームを単離した。最後に、得られたヒトエピモルフィ  
ン断片を、プローブとして使用し、再度、当該cDNA  
ライブラリーをスクリーニングし、エピモルフィンの全  
長をコードするcDNAを単離した。

【0105】得られたcDNAは、前記式(3)に対応  
するヒトエピモルフィンをコードする、前記式(6)に  
対応する塩基配列で表される翻訳領域と、3'及び5'  
側に非翻訳領域を含む遺伝子であり、その全長は、約  
3.0キロベースであることが、アガロースゲル電気泳  
動により、確認された。

【0106】同様にして、前記式(4)、及び(5)に  
対応するヒトエピモルフィンアイソフォームA、及びB  
をコードする遺伝子を、単離した。これらは、それぞ  
れ、前記式(7)、及び(8)に対応する塩基配列を翻  
訳領域として含み、その全長は、それぞれ、約2.9キ  
ロベース、及び2.8キロベースであることが、アガ  
ロースゲル電気泳動により確認された(図4)。得られ  
たヒトエピモルフィンcDNAの翻訳蛋白質は、実施例2  
で得られたマウスエピモルフィンcDNAのそれと90  
%近い相同性がみられ、エピモルフィンは、極めて種間  
差の少ない物質であることが分かった。

【0107】6. マウスエピモルフィン(アイソフォー  
ムA, B) cDNAの単離  
マウス胎児間充細胞から調製したmRNAを、オリゴ

(dT)セルロースカラムにより精製し、これを出発材  
料として、実施例5と同様の方法で、マウスエピモル  
フィンcDNAの単離を行った結果、3種類の異なる長さ  
のcDNAを得、アガロースゲル電気泳動による全長  
は、それぞれ、約3.0、2.9、2.8キロベースで  
あった。

【0108】これらのcDNAの塩基配列を調べた結  
果、最長のものは、実施例2で得られたマウスエピモ  
ルフィンと一致し、更に、マウスエピモルフィンのアイ  
ソフォームとして、前記式(15)の942番目から10  
66番目の塩基配列が削除された全長約2.9キロベ  
ースのアイソフォームAと、前記式(15)の942番  
目から1127番目の塩基配列が削除された全長約2.8  
キロベースのアイソフォームBが、クローニングされ  
た。前者は、前記式(15)の153番目から941番  
目までと、1067番目から1141番目までの塩基配  
列を直結した部分が、アミノ酸に翻訳される。

【0109】このcDNA配列に、終止コドン3塩基を  
追加した塩基配列は、前記式(13)に、このcDNA  
がコードする蛋白質は、前記式(10)に、それぞれ、  
対応する。後者は、前記式(15)の153番目から9  
41番目までと、1128番目から1175番目までの  
塩基配列を直結した部分が、アミノ酸に翻訳され、この  
cDNA配列に終止コドン3塩基を追加した塩基配列  
は、前記式(14)に、このcDNAがコードする蛋白  
質は、前記式(11)に、それぞれ、対応する。

【0110】マウス、ヒト以外の動物種についても、各  
々の動物組織を用いて、実施例5と同様の方法で、エ  
ピモルフィンcDNAを、単離することができる。

【0111】7. エピモルフィンによる肺上皮構造の支  
持

実施例4で得られたエピモルフィントランスフェク  
タント、あるいは無処理のNIH/3T3細胞と、マウス胎  
児から単離した肺上皮組織を混合し、3次元の培養を行  
った。培養数日で、無処理NIH/3T3細胞を用いた  
場合には、肺上皮のチューブ形態が破壊されてしまうの  
に比べ、エピモルフィントランスフェクタントを用いた  
場合には、その形態が保たれたまま上皮が成長をつづ  
け、エピモルフィンが、上皮組織の形態形成に、極めて  
重要な役割を担う作用を有するものであることが確認で  
きた。図5に、1週間後の切片の写真を、また、図6  
に、上皮のうちでチューブ構造をとるものの割合を、そ  
れぞれ、示す。

【0112】8. 無細胞系でのエピモルフィンの合成  
実施例5で得られたヒトエピモルフィンcDNAを、B  
l u s c r i p t I I ベクター(Stratagene  
社より購入)のポリクローニングサイトに組み込み、R  
NAポリメラーゼ、及びStratagene社製のm  
CAP<sup>TM</sup>RNA Capping Kitを利用して、エ  
ピモルフィンmRNAを合成した。次に、得られたmR

NAを<sup>35</sup>S-メチオニンの存在下でウサギ網状赤血球ライセート（アマシャム社）を用いた反応系で反応させて、<sup>35</sup>Sでラベルされたヒトエピモルフィンを合成した。

【0113】合成したヒトエピモルフィンは、前記式（3）に対応する288個のアミノ酸配列で表され、その分子量は、約3万3千であることが、SDS-PAGE電気泳動により確認された（図7）。

【0114】同様にして、前記式（4）に対応する287個のアミノ酸配列、及び前記式（5）に対応する277個のアミノ酸配列で表されるヒトエピモルフィンアイソフォームA、及びBを得た。当該ヒトエピモルフィンアイソフォームA、及びBの分子量は、それぞれ、約3万3千、及び3万2千であることが、SDS-PAGE電気泳動により確認された。

【0115】9. 疎水性部分を欠損した可溶性改変エピモルフィンの動物細胞での合成

実施例2で得られたマウスエピモルフィンcDNAを、実施例4と同様にして、β-アクチンのプロモーターを有する動物細胞発現ベクターpβactCAT9のHindIII-HpaI部位に組み込みこんだ（βactEPM1）。

【0116】次に、HincII、NheIによる消化、末端平滑化、再連結により、エピモルフィンC末端疎水領域をコードする部分を100%欠損させた遺伝子を作成した（βactEPM2）。βactEPM1、βactEPM2を、NIH/3T3細胞に導入してエピモルフィンの発現を調べたところ、βactEPM1を導入したトランスフェクタントは、主として細胞表面に、また、βactEPM2を導入したトランスフェクタントは、主として培養液中に、それぞれ、エピモルフィンが検出され、後者では、エピモルフィンが可溶化されていることが確認された（図8）。

【0117】上記で得られた2種のエピモルフィントランスフェクタント、あるいは無処理のNIH/3T3細胞各々と、マウス胎児から単離した肺上皮組織を混合し、3次元の培養を行った。培養数日で、無処理NIH/3T3細胞を用いた場合には、肺上皮のチューブ形態が破壊されてしまうのに比べ、2種のトランスフェクタントを用いた場合には、いずれも上皮形態が保たれたまま肺胞が成長をつづけ、可溶性エピモルフィンが活性を保持していることが確認された（図9）。

【0118】10. 疎水性部分を欠損した可溶性改変エピモルフィンの大腸菌での合成

実施例2で得られたマウスエピモルフィンcDNAを、pBluscriptII KS (+) (Stratagene社) に組み込んだ後、cDNA 3' 側に存在する制限サイトで切断後、エキソヌクレアーゼIII、Mung Beanヌクレアーゼを利用して、反応時間を変え、エピモルフィン遺伝子が種々の大き

さなるように、3' 側から欠損させたものを作成した。

【0119】切断面を連結後、それらのプラスミドを、大腸菌JM109（宝酒造社）に導入して、遺伝子産物をβガラクトシダーゼとの融合蛋白質として発現させたところ、エピモルフィンのC末端疎水性領域のうち、12個以上のアミノ酸に相当する遺伝子が削除されていたものでは、当該菌をつぶすことにより、容易に融合蛋白質が可溶化されることが判明した。また、N末端から231番目以降のアミノ酸を欠損したエピモルフィンでも、エピモルフィン活性を有することが確認された。

【0120】11. 疎水性部分を親水性蛋白質に置換した可溶性改変エピモルフィンの合成

実施例5で得られたヒトエピモルフィンcDNAのC末端疎水性領域をコードする部分を、実施例10と同様にして、欠損させた。次に、この欠損cDNAをCD4-IgG遺伝子が組み込まれたベクターCDM8 (Romeo and Seed, Cell, 64, 1037-1046, 1991) のCD4領域に、フレームが合うように考慮して、組み込んだ。

20 【0121】これをDeae-Dextran法（「Current Protocols in Molecular Biology」Wiley Interscience (1987)）を用いてCOS-1細胞（ATCC CRL 1650）に導入し、3日後に、培養液を回収した。該培養液を、50%の硫酸アンモニウムにて塩析濃縮後、IgGへの結合能を有するプロテインAの結合した担体を充填したカラム（宝酒造社製）を使用して、C末端の疎水性残基が親水性ペプチドで置換されたヒトエピモルフィン-IgG融合蛋白質を、精製品として大量に回収できた。

30 【0122】当該ヒトエピモルフィンの改変体は、可溶性が高く、かつエピモルフィンの活性を有することが確認された。他の動物種の改変エピモルフィンについても、各々のエピモルフィンcDNAを用いて、実施例9ないし11と同様の方法で、得ることができる。

【0123】12. エピモルフィンに対するポリクローナル抗体の製造

40 a) 実施例5で得られたヒトエピモルフィンのcDNAを用いて、実施例10と同様の方法で、可溶性のヒトエピモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質を、大腸菌に作らせた。大腸菌をつぶした懸濁液（ライセート）から溶液を分離し、更に、SDS-PAGEにかけて、可溶性のヒトエピモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質に相当するバンドを切り出して、純度の高いヒトエピモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質の溶液を得た。

50 【0124】b) a) で得られた可溶性のヒトエピモルフィン-βガラクトシダーゼ融合蛋白質溶液を、等量のフロインド コンプリート アジュバントと混和し、得られた懸濁液をLewisラットに腹腔内投与した。2

週、3週間後に、同液を同様に投与した。最終投与の3日後に、ラットの血液を採取し、常法により、血清を分離し、ヒトエピモルフィンに対する抗血清を得た。更に、該抗血清を、50%硫酸アンモニウムで塩析しPBSで透析後、抗ラットIgGカラム（アメリカンコーレックス社）でアフィニティ精製を行い、ヒトエピモルフィンに対するポリクローナル抗体を得た。該ポリクローナル抗体は、βガラクトシダーゼに対する抗体を含むが、哺乳動物の実験に用いる場合は、このまま用いて良い。該ポリクローナル抗体は、ヒトエピモルフィンに特異的に結合する以外に、マウス、ニワトリ等の他の動物種のエピモルフィンにも結合した。

### 【0125】13. エピモルフィンに対するモノクローナル抗体の製造

実施例3で得られたマウスエピモルフィンを、等量のフロインド コンプリート アジュバントと混和し、得られた懸濁液を、Lewisラットに腹腔内投与した。2週、3週間後に、同液を同様に投与した。最終投与の3日後に、脾臓を摘出し、脾細胞をダルベッコ変法イーグル培地（DME）と、Ham F12の等量混合培地（DH）で、3回洗浄した。マウスミエローマ細胞株P3×63Ag8. U. 1（ATCC CRL 1597）を、同様に洗浄後、その $1 \times 10^7$ 個と、上記脾細胞 $1 \times 10^8$ 個とを50ml遠心管に入れ、混合した。200×G、5分遠心後、上清を、パスツールピペットで除去した。

【0126】次に、細胞のペレットに、37℃に保温したポリエチレングリコール1500（ベリンガーマンハイム山之内社製）50%（W/V）を含むRPMI-1640溶液1mlを、1分間を要して滴下し、混合し、次いで、37℃に保温したRPMI-1640溶液1mlを加えて、1分間放置し、次に、同液2mlを加えて、2分間放置し、更に、同液1mlを加えた。4分間放置後、37℃に保温した12%牛胎児血清、0.05g力価/1-硫酸ストレプトマイシン、60000U/1-ペニシリンGカリウムを含有するDH（以下これを「DH12」という）の8mlを加え、200×Gで、5分間、遠心分離した。上清を除去し、37℃に保温したDH12に、脾細胞 $1 \times 10^6$ 個/mlとなるように懸濁し、24穴のマクロプレート（コースター社）に、1mlずつ分注し、37℃下に、5%炭酸ガスインキュベーター内で、培養した。

【0127】24時間後、 $1.0 \times 10^{-4}$ Mヒポキサンチン、 $4.0 \times 10^{-4}$ Mアミノプテリン、及び $1.6 \times 10^{-5}$ Mチミジンを含む血清入り完全RPMI-1640培地（以下「HAT培地」という）1mlを、各ウェルに添加した。以後、上清の半分を、第2、3、及び4日目に、それぞれ新しいHAT培地に代え、第6日目に、同様に、上清の半分を、 $1.0 \times 10^{-4}$ Mヒポキサンチン、及び $1.6 \times 10^{-5}$ Mチミジンを含む血清入り

完全RPMI-1640培地（HT培地）に代えた。以後、DH12培地で増殖維持した。

【0128】かくして得られるハイブリドーマを、限界希釈法によりクローニングした。すなわち、ハイブリドーマ $3 \times 10^2$ 個、及びBalb/c系マウス胸腺細胞 $1 \times 10^8$ 個を含むように調製したDH12培地の20mlを用いて、ハイブリドーマ3個/ウェルとなるように96ウェルのプレートに播き、培養した。増殖してくるハイブリドーマを、同様にハイブリドーマ1個/ウェルとしてクローニングし、更に、増殖してくるハイブリドーマを、同様にハイブリドーマ0.3個/ウェルとして、クローニングした。

【0129】目的の抗体を産生するクローンの選別は、マウスエピモルフィンに対する抗体の結合能を、ELISA法で判定することにより行った。すなわち、実施例10で得られた可溶性のマウスエピモルフィンの溶液を、96穴のイムノプレート（Nunc Intermed社）に50マイクロリッターずつ分注し、4℃で、一晚静置した後、PBS-0.05%ツィーン20（洗浄液）で、ウェルを洗浄した。

【0130】ブロッキング液として、PBS-5%スキムミルク液100マイクロリッター/ウェルを分注し、室温で、1時間静置後、洗浄液でウェルを洗浄した。次いで、ハイブリドーマの培養上清を50マイクロリッター/ウェル入れて室温で1時間反応させてから洗浄液でウェルを洗浄し、更に、ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識抗ラット免疫グロブリン溶液（カップル社）を、50マイクロリッター/ウェル入れて、室温で、1時間反応させてから、洗浄液でウェルを洗浄する操作を行った。

【0131】最後に、常用されるo-フェニレンジアミンと過酸化水素を含む基質液100マイクロリッター/ウェルを分注し、15分間発色反応させた後、硫酸液で反応を停止させ、492nmの吸光度を測定した。目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清は、未使用培養液（陰性対照）の3倍以上の高い吸光度を示した。かくして、マウスエピモルフィンの活性部位以外の部位に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。このハイブリドーマの培養上清より、実施例1に述べられているのと同様の方法で、マウスエピモルフィンの活性部位以外の部位に結合するモノクローナル抗体を精製できた。

【0132】14. エピモルフィンに対するモノクローナル抗体を用いたエピモルフィンの発現調査  
マウス胎児および成獣の各種臓器を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、包埋剤を用いて凍結試料を作製した。クライオスタットで厚さ10マイクロメートルの切片を作り、乾燥後に、5%スキムミルクを含むPBS、100倍希釈した実施例1で得られたモノクローナル抗体MC-1（mAb12）溶液、フルオレッセンイ

ソチオシアネート (FITC) ラベルされた抗ラット免疫グロブリン (タゴ社) と順次反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて、エピモルフィンの発現様式を調べた。尚、上記の各反応の間に、PBS で十分に洗浄を行い、非特異的な抗体の吸着をおさえた。図10に示すように、エピモルフィンは、胎児期および成獣の臓器再生期で発現量が增大していることが確認できた。

#### 【0133】

【発明の効果】本発明のエピモルフィンは、上皮組織の形態形成作用を有する間充織成分であるので、エピモルフィンそれ自体は、先天性の上皮形態異常症はもとより、各種の臓器の損傷や、脱毛等、後天的な上皮形態の異常の治療薬の開発等に有用である。特に、可溶性に改変したエピモルフィンは、精製が容易であり、更に、所望の濃度の溶液として利用できる長所を有する。

【0134】また、エピモルフィンをコードする遺伝子は、エピモルフィンの大量生産を可能にする他、上記疾患の診断、及び治療法の開発等に極めて有用なものである。また、エピモルフィンに対する抗体は、エピモルフィンの精製、エピモルフィンの検出、上記疾患の診断、及び治療法の開発等に極めて有用なものである。

#### 【0135】

##### 配列

```

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
      5              10              15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
      20              25              30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
      35              40              45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
      50              55              60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
      65              70              75              80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
      85              90              95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
      100             105             110
Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
      115             120             125
Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
      130             135             140
Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
      145             150             155             160
Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
      165             170             175
Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
      180             185             190
Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
      195             200             205
Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr

```

#### \* 【配列表】

配列番号 : 1  
 配列の長さ : 36  
 配列の型 : 核酸  
 鎖の数 : 二本鎖  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : cDNA  
 配列  
 ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG

#### 10 【0136】配列番号 : 2

配列の長さ : 11  
 配列の型 : アミノ酸  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : ペプチド  
 配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys

#### 【0137】配列番号 : 3

配列の長さ : 288  
 配列の型 : アミノ酸  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : ペプチド

\*

57

58

210 215 220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ile Ala Val Ser Val  
 260 265 270  
 Val Leu Val Val Ile Ile Val Leu Ile Ile Gly Leu Ser Val Gly Lys  
 275 280 285

【0138】配列番号 : 4

\* トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 287

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

\*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp  
 5 10 15  
 Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe  
 20 25 30  
 Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln  
 35 40 45  
 Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro  
 50 55 60  
 Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu  
 85 90 95  
 Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu  
 100 105 110  
 Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu  
 115 120 125  
 Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser  
 130 135 140  
 Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe  
 165 170 175  
 Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn  
 180 185 190  
 Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile  
 195 200 205  
 Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr  
 210 215 220  
 Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr  
 245 250 255  
 Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Leu Met Phe Ile Ile Ile Cys Val Ile  
 260 265 270  
 Val Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Thr Leu Ser  
 275 280 285

【0139】配列番号 : 5

※50※配列の長さ : 277

59

60

配列の型 : アミノ酸

\* 配列の種類 : ペプチド

トポロジー : 直鎖状

\*

配列

```

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
      5              10              15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
      20              25              30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
      35              40              45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
      50              55              60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
      65              70              75              80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
      85              90              95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
      100             105             110
Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
      115             120             125
Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
      130             135             140
Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
      145             150             155             160
Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
      165             170             175
Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
      180             185             190
Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
      195             200             205
Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
      210             215             220
Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
      225             230             235             240
Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
      245             250             255
Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn His Ile Pro
      260             265             270
Arg Ala Ile Tyr Pro
      275

```

【0140】配列番号 : 6

※鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 867

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : 核酸

※ 配列の種類 : cDNA

配列

```

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT 16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC 32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA 48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA 64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA 80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA 96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT 112

```



61	62
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA	128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC	144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA	160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC	176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT	192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC	208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT	224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA	240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT	256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA AAG TGG ATA ATT ATT GCT GTG TCA GTG	272
GTT CTG GTT GTC ATA ATC GTT CTA ATT ATT GGC TTG TCA GTT GGC AAA	288
TGA	289

【0141】配列番号 : 7

\* 鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 864

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : 核酸

\* 配列の種類 : cDNA

## 配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT	16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC	32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA	48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA	96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT	112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA	128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC	144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA	160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC	176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT	192
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC	208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT	224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA	240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT	256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG AAA TTG ATG TTC ATT ATT ATT TGT GTA ATT	272
GTT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATC CTA GCA ACA ACA TTG TCA TAG	288

【0142】配列番号 : 8

※ 鎖の数 : 二本鎖

配列の長さ : 834

トポロジー : 直鎖状

配列の型 : 核酸

※ 配列の種類 : cDNA

## 配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG AAG AAT GAT GAT	16
GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC	32
TTC CAT CAG GTG GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA	48
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT CTT TCT GCA CCA	64
AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA	80
ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA	96
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG AGT GGG AAC CGG ACT TCA GTG GAT CTT	112
CGG ATA CGA AGA ACC CAG CAT TCG GTG CTG TCT CGG AAG TTT GTG GAA	128
GCC ATG GCG GAG TAC AAT GAG GCA CAG ACT CTG TTT CGG GAG CGG AGC	144
AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATA ACT GGG AGA ACC ACC ACA	160
GAC GAC GAG CTA GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCA TCC ATC TTC	176
ACT TCC GAC ATT ATA TCA GAT TCA CAAATT ACT AGA CAA GCT CTC AAT	192

63	64
GAA ATC GAG TCA CGT CAC AAG GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC ATC	208
CGA GAG TTG CAT GAG ATG TTC ATG GAC ATG GCT ATG TTT GTG GAG ACT	224
CAG GGT GAA ATG ATC AAC AAC ATA GAA AGA AAT GTT ATG AAT GCC ACA	240
GAC TAT GTA GAA CAC GCT AAA GAA GAA ACA AAA AAA GCT ATC AAA TAT	256
CAG AGC AAG GCA AGA AGG CAA CAA CAT TGT CAT AGC AAC CAT ATC CCA	272
AGA GCC ATT TAT CCT TGA	278

【0143】配列番号 : 9

\* トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 289

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

\*

配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp	
1 5 10 15	
Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly	
20 25 30	
Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala	
35 40 45	
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala	
50 55 60	
Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys	
65 70 75 80	
Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile	
85 90 95	
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp	
100 105 110	
Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val	
115 120 125	
Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg	
130 135 140	
Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr	
145 150 155 160	
Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile	
165 170 175	
Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu	
180 185 190	
Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser	
195 200 205	
Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu	
210 215 220	
Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser	
225 230 235 240	
Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys	
245 250 255	
Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Lys Trp Ile Ile Ala Ala Val Ala	
260 265 270	
Val Ala Val Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile Ile Gly Leu ser Val Gly	
275 280 285	

Lys

【0144】配列番号 : 10

※ トポロジー : 直鎖状

配列の長さ : 288

配列の種類 : ペプチド

配列の型 : アミノ酸

※50

65

66

## 配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys  
 65 70 75 80  
 Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile  
 85 90 95  
 Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp  
 100 105 110  
 Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val  
 115 120 125  
 Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg  
 130 135 140  
 Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile  
 165 170 175  
 Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu  
 180 185 190  
 Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser  
 195 200 205  
 Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu  
 210 215 220  
 Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser  
 225 230 235 240  
 Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys  
 245 250 255  
 Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Lys Val Met Phe Val Leu Ile Cys Val  
 260 265 270  
 Val Thr Leu Leu Val Ile Leu Gly Ile Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ser  
 275 280 285

【0145】配列番号 : 11

配列の長さ : 279

配列の型 : アミノ酸

\* トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

\* 40

## 配列

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Thr Asn Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly  
 20 25 30  
 Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala  
 50 55 60  
 Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asp Lys

67 68

65 70 75 80

Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile

85 90 95

Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu Asn Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp

100 105 110

Leu Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val

115 120 125

Asp Val Met Thr Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Ile Leu Phe Arg Glu Arg

130 135 140

Ser Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr

145 150 155 160

Thr Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile

165 170 175

Phe Ile Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu

180 185 190

Asn Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser

195 200 205

Ile Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu

210 215 220

Thr Gln Gly Glu Met Val Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Val Asn Ser

225 230 235 240

Val Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys

245 250 255

Tyr Gln Ser Lys Ala Arg Arg Gln Gln His Cys His Ser Asn Arg Thr

260 265 270

Pro Arg Ala Leu Cys Pro Arg

275

【0146】配列番号 : 12

配列の長さ : 870

配列の型 : 核酸

\* 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

\* 30 配列の種類 : cDNA

## 配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16

GGA GAC ACT GCT GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32

TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48

CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64

CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80

GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96

GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112

CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128

GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144

AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160

ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176

TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192

AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208

ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224

ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240

GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256

TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 272

GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 288

AAA TGA 50 290

69

70

【0147】配列番号 : 13

配列の長さ : 867

配列の型 : 核酸

\* 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

\* 配列の種類 : cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAG GTG ATG TTC GTC CTC ATT TGT GTA 272  
 GTC ACT TTG CTT GTG ATC CTT GGA ATT ATT CTC GCA ACA GCA TTG TCA 288  
 TAG 289

【0148】配列番号 : 14

配列の長さ : 840

配列の型 : 核酸

※ 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

※ 配列の種類 : cDNA

配列

ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 16  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 32  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 48  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 64  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 80  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 96  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 112  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 128  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 144  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 160  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 176  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 192  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 208  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 224  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 240  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 256  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG CAA CAG CAT TGT CAT AGC AAC CGT ACC 272  
 CCA AGA GCT CTT TGT CCT CGG TGA 280

【0149】配列番号 : 15

配列の長さ : 2940

配列の型 : 核酸

★ 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

★ 配列の種類 : cDNA

配列

GGGCGGGCGG GCTGTGCGGT GGCAGCGCCT GCGGAGGGA GGGCGGCGGC GCGGGGCCAG 60

71

72

GACCCCGGCA GCAAGAGGCG GCGATCGGGC CACCGGAGAG TGTGCGGCGG GGCAGCTGAG 120  
 CGGCGGGTGC CCCGCCCTGC TGGCCGGTGG GG 152  
 ATG CGG GAC CGG CTG CCC GAC CTC ACG GCG TGT AGG ACA AAC GAC GAT 200  
 GGA GAC ACT GCT GTC GTC ATT GTG GAG AAG GAT CAT TTC ATG GAC GGT 248  
 TTC TTC CAT CAG GTA GAG GAG ATT CGA AGC AGC ATA GCC AGG ATT GCT 296  
 CAG CAT GTA GAA GAC GTG AAG AAG AAC CAC AGC ATC ATC CTG TCT GCT 344  
 CCA AAC CCA GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTG GAG GAC CTG GAC AAA 392  
 GAG ATC AAG AAA ACT GCT AAC AGG ATC CGG GGC AAG CTG AAG TCT ATT 440  
 GAG CAG AGC TGT GAT CAG GAC GAG AAT GGG AAC CGA ACT TCA GTG GAT 488  
 CTG CGG ATA CGA AGG ACC CAG CAC TCG GTG CTG TCA CGG AAG TTT GTG 536  
 GAC GTC ATG ACA GAA TAC AAT GAA GCG CAG ATC CTG TTC CGG GAG CGA 584  
 AGC AAA GGC CGC ATC CAG CGC CAG CTG GAG ATC ACT GGG AGG ACC ACC 632  
 ACT GAC GAC GAG CTG GAA GAG ATG CTG GAG AGC GGG AAG CCG TCC ATC 680  
 TTC ATC TCG GAT ATT ATA TCA GAT TCA CAA ATC ACT AGG CAA GCT CTC 728  
 AAT GAG ATC GAG TCC CGC CAC AAA GAC ATC ATG AAG CTG GAG ACC AGC 776  
 ATC CGA GAG CTG CAC GAG ATG TTC ATG GAT ATG GCC ATG TTT GTC GAG 824  
 ACT CAG GGT GAA ATG GTC AAC AAC ATC GAG AGA AAT GTG GTG AAC TCT 872  
 GTA GAT TAC GTG GAA CAT GCC AAG GAA GAG ACG AAG AAA GCC ATC AAA 920  
 TAC CAG AGC AAG GCC AGG CGG AAA AAG TGG ATA ATT GCT GCT GTG GCG 968  
 GTG GCT GTC ATT GCC GTC CTG GCT CTA ATC ATT GGC TTG TCG GTT GGC 1016  
 AAA 1019  
 TGATTGCGTA GATGGCGCTG GGTGCTTGCC TCTCCCTCAG GGTGGCAAAG GTGATGTTGG 1079  
 TCCTCATTTG TGTAGTCACT TTGCTTGTA TCCTTGGAAT TATTCTCGCA ACAGCATTTG 1139  
 CATAGCAACC GTACCCCAAG AGCTCTTTGT CCTCGGTGAC TCCGACCATA CCTGCAGCTT 1199  
 AGTCAGCATC CTGTCTTCC ACGAGTGAAC CTCAGACTCC AGGGCTAGCG CCGAGCACTG 1259  
 AGGTTTTTAT TGGTGATGAA GAAGAAAGCA CCGCAGAGGT TTCGTACCAT GAAACACCGC 1319  
 GAGCCCACTG GATGCGACAT GCCAGCCAG AGAGCCTGGG TCTCTCTCAA GGACACCACA 1379  
 GAGATTTTAC AACAGTGGCC TTGCCTTGGT AGCTTTGAAA TAGGAATGAT TGAAAAAGCC 1439  
 TAATTTTTAA AGACAATGTC AGTGTAAAAA ATGTATGTTG TGTGTAATTA GGGTGTGCTC 1499  
 TCGGCTCAGC TGGCAGTGCT GACGAAGAGA CTTGAGGCCA GGCCTGATCT CTGTTTATGT 1559  
 CTGTGTTGCA GAATCATCAC AGAACTGTTT TGTAAGGCAT CTGTAAGTTA AGTTCCTTAA 1619  
 TCTATTAACA TCTAACTCC CTTTCTAAGC TAGACACTGC CTGCGAAGG ACAATGGGCC 1679  
 AGCCCGGGC AAGCATGAAC ACTGCCTTAC AGCCCTCAG GGCCTTCTA TAGTGCTTTC 1739  
 TGGTGACCT GACTAGGAAG TGTGAGGTC TGAAGAGCCT TGAACGTTAG CTCACGGAGG 1799  
 GGACAAGCAG TCACATGCCG CACTCATGTT ACTCTCCCTT GTTCATGTGA GCTGATGAAG 1859  
 TCTCAAGGCA AGGCGACAGT GACGATGGAC CAACTCGGT GCTCACTAAA CTCAAGAGAA 1919  
 TGGCCCGGAG TACATAGCCA CTCTGGATG GCACCTGAAG GACCAGGTCC TCAGCCCAAC 1979  
 ACCACGAGT GCCCAGAGTT CTAAGAAAC CATGAAGTGT GGGATAAAGC TGTGCACTGG 2039  
 TTTACACTTG TGAATAGATG GCCCAGCGAC CAAGTATGTG AAGGATACCA TGAAGTGA 2099  
 ACTCTGCCAA CTGCTGACTG TGATGAGTGC TCACTCTACC CCAGCCTCAC TTGGTGGGAT 2159  
 ATGACGTAGC CATGCCGGGT CAGAACACCA AGTGTGAGCA AGTGCTACTG AACTATCTAA 2219  
 AAACCATGAT CCTTTCAGTG GTAAGTGTGC CACACTGTCA CCTCCTCACA CCTTCTGGTC 2279  
 TGACACCCCA TGTGCCGAGA GCTACTGCAG CAGGCTGGG TGTGGGTCCCT GGTCTAGAGT 2339  
 TAGCCTGTAG TGCAGCCACT CTGGCTGAT AGCTCACCT TCCGCAACCG GGAGCTCACC 2399  
 CTTCTGCCT GGAAGCTCAC ACTTCTGTG TGGGAGCTCA CCCTTCTTGC CTGGGAGCTC 2459  
 ACACCTCCCG TCTGGGAGCT CACACTTCT TCTGGGAGC TCACACTTCC TGCTGGGAG 2519  
 CTCACCTTC CGCCTGGGA GCTCACACTT CTGCTGGG AGCTCTGAAG ATGAACCTGG 2579  
 GCCTTTGCAG CTCACCTCT CTGCATCAGT CAGTGCCATC GGATTTAGCT GCAGAGACCA 2639  
 TGGTACCAC CCAGGCTCCC ACCACCCACA GCCAGGTGTC CCTCCAGTCC AGCCTGAGCC 2699  
 CTGGCCTGC AGTGTGCTG CAGAGCGCTC AGGACCTC TCGACCAGG AGGCAGCTGA 2759

73

74

ATCTGGATT CCAGTGAATC AGGGGTGTGT GGGTGACTGA GTCAGCACTC CAGATACATC 2819  
 TCTCTGCTGA CTTCATAGCC TATTTAAAAA TATATTTACA GATTCCCTTG TTACCTTTTC 2879  
 CAAGCATTTT TTCAATATT TTGTGTTTAC ATTA AAAAGT TCTCAGAGAT GCAAAAAAAA 2939  
 A 2940

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗体による、エピモルフィン活性阻害における形態形成の異常を示す（顕微鏡写真）。

【図2】本発明の抗体による、精製エピモルフィンの電気泳動パターンを示す。

【図3】エピモルフィンcDNAを導入する場合と、しない場合のNIH/3T3のエピモルフィン発現を示すウェスタンブロットの一例を示す。

【図4】ヒトエピモルフィン、ヒトエピモルフィンアイソフォームA及びBの各cDNA（いずれも全長）をアガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

【図5】エピモルフィンcDNAを導入する場合と、しない場合のNIH/3T3の培養下での肺上皮形態支持能を示す組織切片（顕微鏡写真）を示す。

【図6】図5で示した上皮形態を定量化したもの、すな

\* わち培養4日目で上皮のうちチューブ構造を保持して成長しているものの割合を示す。

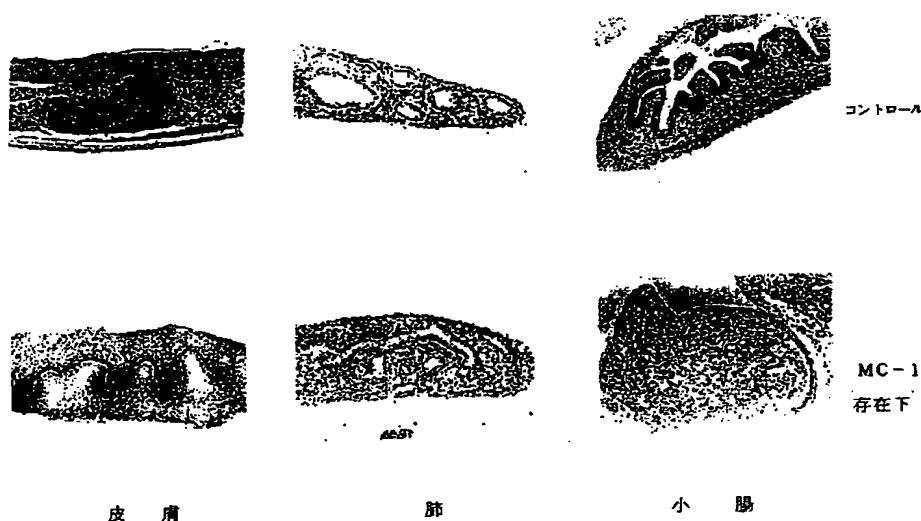
【図7】無細胞系で合成したヒトエピモルフィンをSDS-PAGEで電気泳動した結果を示す。

【図8】C末端に疎水領域が存在するエピモルフィンと、存在しないエピモルフィンの発現様式を示すウェスタンブロットの例を示す。

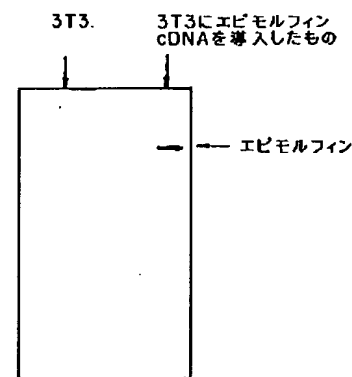
【図9】C末端に疎水領域が存在するエピモルフィンと、存在しない可溶性エピモルフィンが、いずれも肺上皮の形態形成能を有することを示す培養実験の観察像（顕微鏡写真）を示す。

【図10】本発明抗体による、エピモルフィン発現様式の調査結果（顕微鏡写真）を示す（エピモルフィンを強発現している部分は明るく染まっている）。

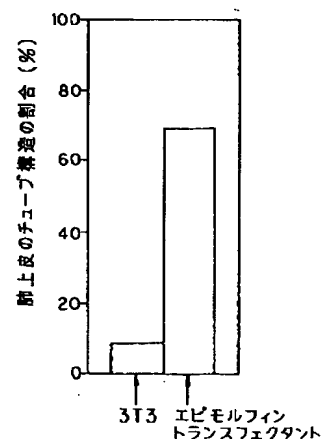
【図1】



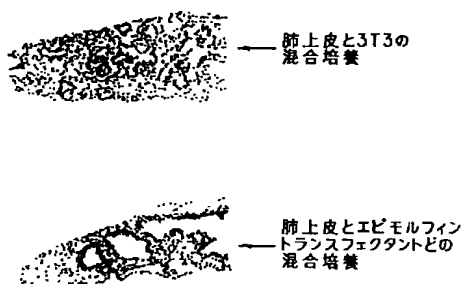
【図3】



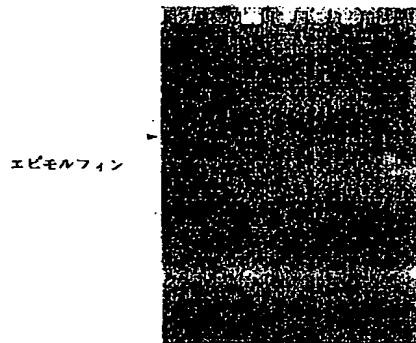
【図6】



【図5】



【図2】



【図10】

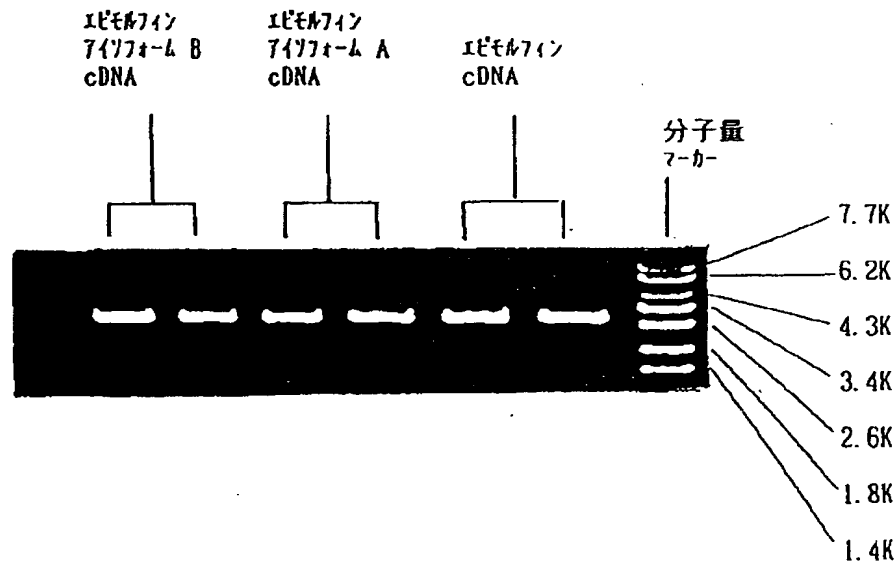


15日目の胎児肺

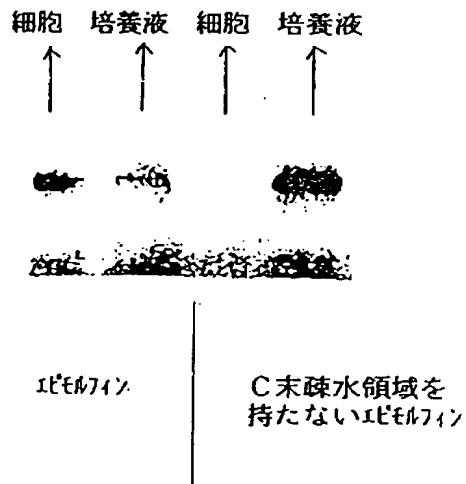
16日目の胎児皮膚  
(毛包)

15日目の胎児小腸

【図4】

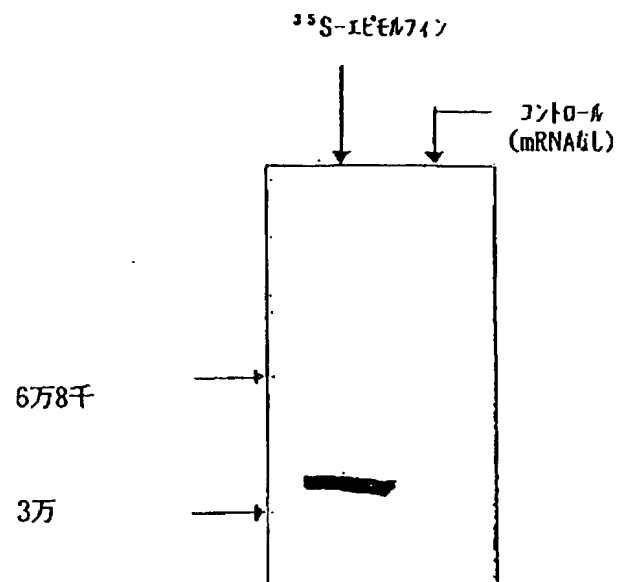


【図8】



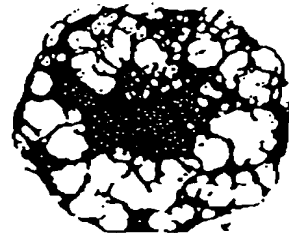


【図7】

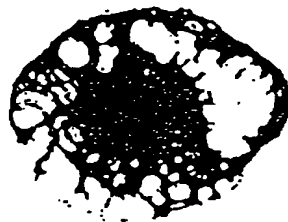


【図9】

培養10日目



3T3 + 肺上皮

エピモルフィン発現トランスフェクト  
+ 肺上皮C末端疎水領域を持たない  
可溶性エピモルフィン発現トランスフェクト  
+  
肺上皮

## 【手続補正書】

【提出日】平成5年6月15日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗体による、エピモルフィン活性阻害における形態形成の異常を示す（生物の組織形態の顕微鏡写真）。

【図2】本発明の抗体による、精製エピモルフィンの電気泳動パターンを示す。

【図3】エピモルフィンcDNAを導入する場合と、しない場合のNIH/3T3のエピモルフィン発現を示すウェスタンブロットの一例を示す。

【図4】ヒトエピモルフィン、ヒトエピモルフィンアイソフォームA及びBの各cDNA（いずれも全長）をアガロースゲルで電気泳動した結果を示す。

【図5】エピモルフィンcDNAを導入する場合と、しない場合のNIH/3T3の培養下での肺上皮形態支持

能を示す組織切片（生物の組織形態の顕微鏡写真）を示す。

【図6】図5で示した上皮形態を定量化したもの、すなわち培養4日目で上皮のうちチューブ構造を保って成長しているものの割合を示す。

【図7】無細胞系で合成したヒトエピモルフィンにSDS-PAGEで電気泳動した結果を示す。

【図8】C末端に疎水領域が存在するエピモルフィンと、存在しないエピモルフィンの発現様式を示すウェス

タンブロットの例を示す。

【図9】C末端に疎水領域が存在するエピモルフィンと、存在しない可溶性エピモルフィンが、いずれも肺上皮の形態形成能を有することを示す培養実験の観察像（生物の組織形態の顕微鏡写真）を示す。

【図10】本発明抗体による、エピモルフィン発現様式の調査結果（生物の組織形態の顕微鏡写真）を示す（エピモルフィンを強発現している部分は明るく染まっている）。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/28		8517-4H		
C 1 2 N 5/26				
15/12				
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
G 0 1 N 33/53		D 8310-2 J		
33/577		B 9015-2 J		
// A 6 1 K 37/02	A D A	8314-4C		
39/395		N 9284-4C		
C 1 2 N 15/08				
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				
C 0 7 K 99:00				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

(31) 優先権主張番号 特願平4-135692

(32) 優先日 平4(1992)4月30日

(33) 優先権主張国 日本(JP)